

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA II



MATRICES POLIMÉRICAS BIOCOMPATIBLES COMO SISTEMA
DE INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA. DISEÑO DE BIOSENSORES
AMPEROMÉTRICOS

TESIS DOCTORAL DE:

JUAN PABLO HERVÁS PÉREZ

DIRIGIDA POR:

BEATRIZ LÓPEZ RUÍZ
ENRIQUE LÓPEZ CABARCOS

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Química Física II**



***Matrices poliméricas
biocompatibles como sistema
de inmovilización enzimática.
Diseño de biosensores
amperométricos***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Juan Pablo HERVÁS PÉREZ

*Bajo la dirección de los Doctores
Beatriz López Ruíz y Enrique López Cabarcos*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Química Física II



***Matrices poliméricas biocompatibles
como sistema de inmovilización enzimática.
Diseño de biosensores amperométricos***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR
Juan Pablo HERVÁS PÉREZ

*Bajo la dirección de los Doctores
Beatriz López Ruíz y Enrique López Cabarcos*

Madrid, 2012

ÁNGELES M. HERAS CABALLERO, Directora del Departamento de Química Física II de la Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado ***“Matrices poliméricas biocompatibles como sistema de inmovilización enzimática. Diseño de biosensores amperométricos”***, ha sido realizado en el Departamento de Química-Física II y en la Sección Departamental de Química Analítica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid por el licenciado **Juan Pablo Hervás Pérez**, bajo la dirección coordinada de los doctores Enrique López Cabarcos y Beatriz López Ruiz, constituyendo la Tesis Doctoral del interesado.

Madrid, 14 de noviembre de 2012.

Fdo. Ángeles M. HERAS CABALLERO

ENRIQUE LÓPEZ CABARCOS y BEATRIZ LÓPEZ RUIZ, Profesores Titulares del Departamento de Química-Física II y de la Sección Departamental de Química Analítica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado ***“Matrices poliméricas biocompatibles como sistema de inmovilización enzimática. Diseño de biosensores amperométricos”***, ha sido realizado en el Departamento de Química-Física II y en la Sección Departamental de Química Analítica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid por el Licenciado **Juan Pablo Hervás Pérez**, bajo su dirección, constituyendo la Tesis Doctoral del interesado, cuya presentación autorizamos.

Madrid, 14 de noviembre de 2012.

Fdo. Enrique LÓPEZ CABARCOS

Fdo. Beatriz LÓPEZ RUIZ

A mi familia

A mi tía Juani

*No importa que uno se caiga,
siempre y cuando recoja algo del suelo al levantarse*

Observación de Avery

Agradecimientos

Quizá este sea el momento más agradable de escribir y el que mayor miedo me da, quizá porque hay tantas personas a las que agradecer tanto que unas palabras escritas puede que se queden cortas para expresar lo que ahora y durante todo este tiempo he sentido.

Tras un periodo de diez años que ha supuesto una etapa de continuo estudio, esfuerzo y aprendizaje, he comprendido que el fruto ha llegado tras el trabajo y la dedicación, y ha sido alimentado gracias a todas las personas que me han acompañado y ayudado sin las que habría resultado imposible completar esta tarea.

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de tesis, Dra. Beatriz López Ruiz y Dr. Enrique López Cabarcos, por haberme dado esta oportunidad, porque de ella y de ellos he aprendido mucho. Gracias por confiar en mí y seguir manteniendo vuestra confianza a pesar de no haber estado al 100% en diversas épocas de la tesis. Gracias por el tiempo y esfuerzo dedicado a mi formación, a mi enriquecimiento como investigador y como persona.

De un modo especial quiero agradecer a Marta. Ha sido un privilegio trabajar codo con codo contigo y, además de una amiga, has sido un referente durante todos los años que he trabajado a tu lado. Muchísimas gracias por tu participación activa en mi tesis doctoral, así como en el legado que has dejado en mí y, por encima de todo, por tu inestimable amistad. Hemos compartido juntos buenos y malos momentos, risas, lágrimas, pero sobre todo, la esperanza de seguir

manteniendo todo lo bueno que estos años nos han dejado durante muchos muchos años.

Durante los años de realización de tesis he tenido la suerte de trabajar con un equipo estupendo en lo profesional y lo personal. Por ello a mis queridos compañeros con los que he compartido gran parte de mi tesis Jorge, Faleh, Mohammed, Begoña, y Lorena, gracias por vuestra inestimable ayuda a pie de laboratorio y por los buenos momentos que he disfrutado con vosotros que serán sin duda el recuerdo más dulce de esta tesis. También quiero agradecer a Cuca y Silvia, aunque su paso por el laboratorio fue más fugaz, también disfruté de su compañía. Agradecer también a los profesores Sofía Ródenas, M^a Carmen Martín, Pedro A. Carvajales, Gregorio Carcedo, Elena Rodríguez, Laura Martín Carbajo, M^a Antonia Martín, Ana I. Olives, Cristina Coronel, Francisco G^a Blanco, Conchita Arias, Conchita Civera, Carmen Rueda, Begoña Elorza, M^a Ángeles Elorza, Paz Sevilla, Ismael Gómez-Escalonilla, Esther Gil, Jose Carlos Menéndez, Rosa Rodrigo, por todo el apoyo tanto humano como técnico que ha servido para mejorar mi capacidad investigadora y personal. A toda la gente de la Secretaría de la Facultad, a Mari, Celina, Amparo, Sole y Paco, por ayudarme con la burocracia y dar apoyo moral siempre.

Durante todo este tiempo mi familia ha sido gran parte del motor que me ha mantenido y que ha propiciado el estar donde estoy, el ser quien soy, por todo ello quiero agradecer a mi madre, a mi padre a mi hermano, a mis tías, a mi abuela, a mis sobrinos y a mi cuñada, todo el apoyo y el saber que estaban ahí siempre, en silencio pero estaban. Gracias por entenderme (o tratar de hacerlo, que mira que soy complicado a veces), por aconsejarme, por escucharme, por ser vosotros.

Durante esta etapa de mi vida he tenido la suerte de conocer a mucha gente que han hecho que mi vida cambiase completamente. Mis amigos, todos esos que han estado escuchando, consolando, apoyando y haciéndome reír.

A los chicos de Lozoyuela, esos que llevan conmigo desde hace ya unos 30 años (Dios como pasa el tiempo), y los años que nos quedan.... A Luismi, Gustavo, Emilio, Oscar, Rosa, Nuria y Patricia.

A mis queridos “vecinas y amigas”, esos que han cambiado mi forma de pensar, de sentir, de expresar y de decir; A Nieves, Belén, Jose Luis, Joaquín, Borja, Félix y Miguel.

A mi nueva gente de GMadrid, que han hecho que sienta tener ganas de que llegasen los miércoles a las 22:30.... A Mariela, Manu, Eloy, David, Gio, Javi, Yoenis, Ally, Daylu, Qussa, Alex, sois tantos que se me olvida muchos, pero sabéis que os agradezco vuestro apoyo.

A mis compañeros y mis amigos de PH, que durante mucho tiempo hemos disfrutado, sonreído y llorado juntos. A Raquel, Irene, Rosana, Gemma, Almu, Sandra, Luis, Roberto, Jorge, Julia, a todos los demás, gracias también.

Gracias a todos los que no he nombrado y que si estás leyendo esto es muy posible que merezcas estar en estas páginas, y que sabéis que me habéis ayudado, perdón por no nombraros, no me lo tengas en cuenta, pero mi cabeza ya sabéis como es... GRACIAS.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	25
1.1.	Microgeles	27
1.1.1.	<i>Definición y propiedades de los microgeles</i>	27
1.1.2.	<i>Teoría de hinchamiento</i>	30
1.1.3.	<i>Microgeles inteligentes</i>	34
1.1.4.	<i>Métodos de síntesis de los microgeles</i>	39
1.1.5.	<i>Aplicaciones de los microgeles</i>	44
1.2.	Biosensores	46
1.2.1.	<i>Características de la respuesta de un biosensor</i>	48
1.2.2.	<i>Clasificación de los biosensores</i>	49
1.2.3.	<i>Biosensores enzimáticos</i>	61
1.2.4.	<i>Aplicaciones y perspectivas futuras de los Biosensores</i>	71
2.	OBJETIVOS	77
3.	REACTIVOS, INSTRUMENTACIÓN Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	83
3.1.	Reactivos y disoluciones	85
3.1.1.	<i>Reactivos</i>	85
3.1.2.	<i>Preparación de disoluciones</i>	86
3.2.	Instrumentación	87
3.2.1.	<i>Calorimetría diferencial de barrido</i>	87
3.2.2.	<i>Difracción de rayos X</i>	88
3.2.3.	<i>Microscopía electrónica de barrido</i>	88
3.2.4.	<i>Espectrofotometría de absorción UV-VIS</i>	89
3.2.5.	<i>Analizador de partículas Galai-Cis</i>	90
3.2.6.	<i>Dispersión de luz láser</i>	90
		21

3.2.7.	<i>Amperometría</i>	91
3.2.8.	<i>Voltamperometría cíclica</i>	92
3.2.9.	<i>Potenciometría</i>	92
3.2.10.	<i>Electrodos, células de trabajo y membrana de diálisis</i>	93
3.3.	Procedimientos Experimentales	93
3.3.1.	<i>Inmovilización de enzimas redox en microgeles</i>	93
3.3.2.	<i>Preparación de disoluciones</i>	100
3.3.3.	<i>Procedimiento de medida</i>	102
3.3.4.	<i>Estudio de los parámetros analíticos del Biosensor</i>	104
4.-	RESULTADOS	109
	Introducción	111
4.1.	"Biosensor amperométrico para la medida de galactosa compuesto por microgeles de poliacrilamida"	112
4.2.	"Amperometric biosensors based on choline oxidase entrapped in polyacrylamide microgels". Biosensor amperométrico formado por colina oxidasa inmovilizada en microgeles de poliacrilamida	133
4.3.	"The application of methacrylate-based polymers to enzyme biosensors". Aplicación de polímeros de metacrilato al diseño de biosensores amperométricos	145
4.4.	"Encapsulation of glucose oxidase within poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate microparticles for developing an amperometric glucose biosensor". Encapsulación de glucosa oxidasa en micropartículas de poli(etilenglicol) metil ether metacrilato para el desarrollo de un biosensor amperométrico de glucosa	159
4.5.	"Amperometric glucose biosensor based on biocompatible poly(dimethylaminoethyl) methacrylate microparticles". Biosensor amperométrico de glucose formado por micropartículas biocompatibles de poli(dimetil amino etil) metacrilato	169

5. DISCUSIÓN	177
5.1. Microgeles de PAAm como sistema de inmovilización enzimática. Preparación y caracterización de los microgeles de PAAm	179
5.2. Respuesta de los distintos biosensores de PAAm	190
5.2.1. Biosensor para la determinación de galactosa preparado con microgeles de PAAm con galactosa oxidasa	190
5.2.2. Biosensores para la determinación de colina, acetilcolina y nicotina preparados con microgeles de PAAm con colina oxidasa y colina oxidasa/acetilconilesterasa	193
5.3. Microgeles de poli(ácido metacrílico). Biosensor para la determinación de glucosa preparado con microgeles de PAAm con galactosa oxidasa	199
5.3.1. Control de la síntesis	200
5.3.2. Caracterización de la matriz polimérica	203
5.3.3. Propiedades del biosensor	204
5.3.4. Propiedades analíticas	208
5.3.5. Estudio de interferencias	209
5.3.6. Determinación de glucosa en sueros sanguíneos	210
5.4. Microgeles de metacrilatos como sistema de inmovilización enzimática	213
5.5. Biosensores para la determinación de glucosa preparados con microgeles de metacrilatos con glucosa oxidasa	218
6. CONCLUSIONES	227
7. ANEXO. LISTA DE ABREVIATURAS	233

1

INTRODUCCIÓN

1.1. Microgeles

1.1.1. Definición y propiedades de los microgeles

En los últimos años se ha producido un gran desarrollo en la búsqueda de nuevos materiales basados en polímeros hidrofílicos, dando como resultado la obtención de nuevos polímeros ó a la modificación de otros ya conocidos consiguiéndose así nuevas propiedades. Los materiales poliméricos de síntesis surgieron como una alternativa a los soportes de materiales inspirados en la naturaleza. Son numerosos los trabajos publicados sobre las propiedades de los polímeros que contienen grupos hidrofílicos unidos a la cadena principal o en cadenas laterales como los poli(metacrilatos) con grupos hidroxilo o amino en su estructura¹⁻⁷.

Dentro de los materiales sintéticos inspirados en la naturaleza, encontramos a los hidrogeles, compuestos por homopolímeros ó copolímeros formados por redes poliméricas tridimensionales. La estructura de red es debida a la presencia de entrecruzamientos químicos (proporcionados por enlaces covalentes) ó físicos (formados por interacciones secundarias no covalentes, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, hidrofóbicas y electrostáticas)⁸, que proporcionan al gel su estructura e

¹ G. Bayramoğlu, E. Yalçın, M.Y. Arica, *Process. Biochem.* **40**, 3505 (2005).

² S.H. Kim, S. Kim, V.K. Yadavalli, M.V. Pishko, *Anal. Chem.*, **77**, 6828 (2005).

³ J. Křížová, A. Španová, B. Rittich, D. Horák, *J. Chromat. A*, **1064(2)**, 247 (2005).

⁴ K. Kejlová, J. Labský, D. Jírová, H. Bendová, *Toxicology in Vitro*, **19(7)**, 957 (2005).

⁵ E. Themistou, C.S. Patrickios, *Eur. Polym. J.* **43(1)**, 84 (2007).

⁶ D. Peng, X. Zhang, C. Feng, G. Lu, S. Zhang, X. Huang, *Polymer*, **48(18)**, 5250 (2007).

⁷ T.G. Tihan, M.D. Ionita, R.G. Popescu, D. Iordachescu, *Materials Chem. Phys.* **118(2-3)**, 265 (2009).

⁸ E. Birch, L.A. Coury, W.R. Heineman, *Anal. Chem.*, **62**, 1123-1130 (1990).

integridad física^{9,10}. Estas redes macromoleculares entrecruzadas, sufren cambios de volumen reversibles como respuesta a estímulos externos tales como el pH, la temperatura, fuerzas iónicas, campos eléctricos, etc, pudiendo existir en dos fases, hinchados y colapsados.

Existen numerosas aplicaciones de estos sistemas poliméricos en campos de la medicina y farmacia. Los hidrogeles se asemejan al tejido vivo debido a su elevado contenido en agua, que, además de contribuir a su biocompatibilidad, le proporciona una consistencia suave, similar al tejido natural. Algunos hidrogeles pueden emplearse en la fabricación de lentes de contacto, como componentes de corazones artificiales, materiales para piel artificial, dentro de sistemas de administración de fármacos, en la tecnología alimentaria, como parte de dispositivos para su utilización dentro de sistemas de control de calidad, así como en la fabricación de membranas sintéticas para su uso en biosensores¹¹⁻¹⁶.

Las características particulares de los hidrogeles pueden resumirse en las siguientes:

- Carácter hidrófilo, debido a la presencia en su estructura de grupos polares tales como -OH, -COOH, -CONH₂, etc.
- Insolubilidad en agua, debida a las uniones químicas entre cadenas que originan toda una red polimérica tridimensional.
- Hinchamiento en agua con aumento considerable de su volumen hasta alcanzar el equilibrio físico-químico, sin perder su forma.

⁹ N.A. Pepas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichiwaka, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **50**, 27 (2000).

¹⁰ C. Peniche, C. Elvira, J. San Román, *Polymer.*, **39**, 6549 (1998).

¹¹ Y. Yang, S. Mu, H. Chen, *Synth. Metals.*, **92(2)**, 173 (1998).

¹² A. Blandino, M. Macias, D. Cantero, *Process Biochem.*, **36**, 601 (2001).

¹³ E.J. Calvo, R. Etchenique, L. Pietrasanta, A. Wolosiuk, C. Danilowicz, *Anal. Chem.*, **73(6)**, 1161 (2001).

¹⁴ S. Braham, D. Narinesingh, A. Guiseppi-Elie, *Biosens. Bioelectron.*, **17**, 53 (2002).

¹⁵ C.A. Marquette, L.J. Blum, *Sensors and Actuators B*, **90(3)**, 112 (2003).

¹⁶ F.N. Kok, V. Hasirci, *Biosens. Bioelectron.*, **19**, 661 (2004).

Aunque no existe una definición universal de microgel, se puede decir que es una macromolécula entrecruzada intramolecularmente con propiedades intermedias entre los polímeros ramificados y los sistemas entrecruzados macroscópicos¹⁷, con diámetros comprendidos entre 0,01 y 5 μm ¹⁸⁻¹⁹, aunque la definición de la IUPAC extiende el tamaño hasta 100 μm ²⁰. Las dimensiones de los microgeles son comparables a las de polímeros lineales de alto peso molecular y sin embargo, su estructura interna es más próxima a la de una red entrecruzada²¹. Presentan una estructura porosa de tal forma que en el disolvente adecuado, al igual que los sistemas entrecruzados, se hinchan en lugar de disolverse, pero debido a su tamaño coloidal forman dispersiones coloidales en lugar de sistemas hinchados macroscópicos.

Los microgeles constituyen materiales de interés debido a que presentan propiedades comunes con:

- las micropartículas sólidas, lo que facilita su tratamiento y procesado dotándoles de especiales propiedades.
- los polímeros solubles, facilitando por ejemplo la caracterización química de los mismos.
- los macrogeles, lo que les hace capaces de hincharse e incluso variar su hinchamiento en respuesta a estímulos.

Los geles coloidales tienen características similares a sus homólogos macroscópicos, pero a diferencia de estos, cuentan con una elevada velocidad de respuesta a diferentes cambios, lo que aumenta su aplicabilidad²². Las propiedades más interesantes de los microgeles provienen de su carácter coloidal, el cuál se consigue mediante el control del tamaño de las moléculas entrecruzadas en crecimiento o formación

¹⁷ W. Funke et al. *Polymer International*, **30**, 519 (1993).

¹⁸ B.R. Saunders, B. Vincent, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **80**, 1. (1999).

¹⁹ R. Pelton, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **85**, 1 (2000).

²⁰ IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997).

²¹ M.J. Murray and M.J. Snowden, *Adv. Colloid Interf. Sci.*, **54**, 73 (1995).

²² Kúdela, V., In: *Encyclopaedia of Polymer Science and Engineering*. Wiley, New York, **7**, 783 (1987).

durante la síntesis. Por todo esto los microgeles son materiales prometedores en la biomedicina del futuro.

1.1.2. Teoría del hinchamiento

En un disolvente adecuado, el hinchamiento de un microgel es el resultado del balance entre la tendencia del polímero a disolverse y la tensión elástica provocada por los entrecruzantes.

El equilibrio de hinchamiento se alcanza cuando el potencial químico (μ) de cada componente i , es el mismo dentro (α) y fuera (β) del gel, es decir, cuando no existe transferencia de disolvente a través de la interfase gel-disolvente²³.

$$\mu_i^\alpha = \mu_i^\beta \quad [1]$$

Por tanto, la presión osmótica (π) en un gel debe ser cero cuando se alcanza el equilibrio. Si $i=1$ representa el disolvente, la ecuación [1] se escribe de la forma:

$$\Delta\pi_{\text{hinchamiento}} = \frac{\mu_1^{\text{gel}} - \mu_1^{\text{externo}}}{V_1} = 0 \quad [2]$$

siendo $\Delta\pi_{\text{hinchamiento}}$ la presión osmótica y V_1 el volumen molar del disolvente.

Teniendo en cuenta la teoría de Flory-Rehner²⁴, $\Delta\pi_{\text{hinchamiento}}$ se puede expresar en función de tres contribuciones: i) la contribución elástica de las cadenas de polímero deformadas desde su estado de referencia ($\Delta\pi_{\text{elástica}}$), ii) la contribución de la presión osmótica de la mezcla polímero-disolvente ($\Delta\pi_{\text{mezcla}}$) y iii) la contribución en el caso de microgeles iónicos, de los efectos

²³ S. Hirotsu, *Phase Transitions*, **47** 3, 4(1994).

²⁴ P. Flory, *Principles of Polymer Chemistry*, Cornell University Press, Ithaca. **Chapter 13**. (1953).

electrostáticos ($\Delta\pi_{ión}$). Este último término también es conocido con el nombre de efecto Donnan.

$$\Delta\pi_{hinchamiento} = \Delta\pi_{elástica} + \Delta\pi_{mezcla} + \Delta\pi_{ión} \quad [3]$$

Cada uno de estos términos se expresa del siguiente modo:

$$\Delta\pi_{elástica} = \frac{N_c kT}{V_0} \left[\left(\frac{\phi}{2\phi_0} \right) - \left(\frac{\phi}{\phi_0} \right)^{1/3} \right] \quad [4]$$

$$\Delta\pi_{mezcla} = \frac{N_A kT}{V_0} [\phi + \ln(1-\phi) + \chi\phi^2] \quad [5]$$

$$\Delta\pi_{ión} = \frac{fN_c kT}{V_0} \frac{\phi}{\phi_0} \quad [6]$$

Donde N_A es la constante de Avogadro, N_c es el número efectivo de cadenas, k la constante de Boltzman, T la temperatura, ϕ_0 y V_0 son la fracción en volumen de polímero y el volumen del microgel en un estado de referencia que se suele tomar como el del gel no hinchado, ϕ es la fracción en volumen de polímero en el gel hinchado, f el número de contraiones por cadena de polímero y χ es el parámetro de interacción de Flory. Asumiendo que el hinchamiento es isotrópico, se puede establecer la siguiente relación entre el diámetro de un microgel esférico y la fracción del volumen del polímero:

$$\frac{\phi}{\phi_0} = \frac{V_0}{V} = \left[\frac{d_0}{d} \right]^3 \quad [7]$$

donde V es el volumen del microgel hinchado, V_0 es el volumen del microgel colapsado, d_0 y d son los diámetros del gel colapsado e hinchado respectivamente.

Los términos $\Delta\pi_{\text{mezcla}}$ y $\Delta\pi_{\text{ión}}$ comúnmente favorecen la entrada del disolvente, y son función del parámetro de interacción polímero-disolvente y del número de cargas respectivamente. Sin embargo, $\Delta\pi_{\text{elástica}}$ se opone a la entrada del disolvente. De acuerdo con esta expresión, el disolvente penetrará o saldrá del hidrogel hasta que se logre el equilibrio y la suma de los tres términos se anule.

Existen diversos factores que pueden afectar significativamente al hinchamiento de las redes poliméricas entrecruzadas, entre los que se distinguen factores internos, inherentes a la propia red polimérica, y externos, que pueden ser cambiados alterando las condiciones ambientales²⁵⁻³⁰

Factores internos:

- *Densidad de entrecruzamiento:* Cuanto mayor es la relación entre los moles de agente entrecruzante y los de las unidades repetidas de monómero, menor será la capacidad de hinchamiento. El entrecruzamiento restringe el posible movimiento de las cadenas del polímero, disminuyendo la capacidad de almacenamiento de disolvente en el microgel.
- *Estructura molecular del polímero:* La composición del microgel determina las interacciones polímero-disolvente que controlan el hinchamiento de la red entrecruzada. Los microgeles obtenidos de la polimerización de monómeros con gran afinidad por el disolvente, presentarán mayor hinchamiento

²⁵ A.R. Krane, N.A. Peppas, *Polymer News*, **16**, 230 (1991).

²⁶ M.B. Huglin, Y. Liu, J.L. Velada, *Polymer*, **38**, 5785 (1997).

²⁷ I. Ohmine, T. Tanaka, *J. Chem. Phys.*, **77**, 5735 (1982).

²⁸ A. Suzuli, T. Tanaka, *Nature*, **346**, 345 (1990).

²⁹ K.K. Lee, E.L. Cussler, M. Marchetti, M.A. McHugh, *Chem. Eng. Sci.*, **45**, 766 (1990).

³⁰ M. Shibayama, F. Ikkai, S. Inamoto, S. Noumra, C.C. Han, *J. Chem. Phys.*, **105**(10), 4358 (1996).

que los obtenidos con monómeros de menor afinidad.

Factores externos:

- *Temperatura:* El hinchamiento puede aumentar con la temperatura, o disminuir con ella^{31,32}.
- *pH:* Este factor es importante en geles que contienen grupos ionizables dado que el pH del medio afecta al grado de ionización de estos microgeles. Cuando estos grupos se disocian se originan fuerzas repulsivas entre las cargas del mismo signo originadas en el microgel. Dichas repulsiones provocan un aumento de la presión osmótica en el gel, lo que a su vez origina un aumento en el grado de hinchamiento³².
- *Fuerza iónica:* Cuanto mayor es la concentración de sales en la disolución, mayor es la cantidad de iones que penetran en el gel para satisfacer el equilibrio de Donan. En consecuencia los grupos iónicos de los polielectrolitos se ven apantallados por los contraiones y disminuyen las fuerzas osmóticas que favorecen el hinchamiento.
- *Campo eléctrico:* El efecto más importante al aplicar un campo eléctrico, parece ser la migración y redistribución de los iones y contraiones añadidos en la disolución de hinchamiento³³. Es por ello que para un gel ionizable, a distintas intensidades de campo, el hinchamiento es distinto siempre que se mantengan constantes el resto de posibles variables³⁴.
- *Radiación:* Si el gel contiene en su estructura interna grupos fotosensibles, suele cambiar el

³¹ M.B. Huglin, M.M. Rehab, M.B. Zakaria, *Macromolecules*, **19**, 2986 (1986).

³² N.H. Valderruten, *Tesis Doctoral*, UPV/EHU (2001).

³³ G. Giannetti, Y. Hirose, Y. Hirokawa, T. Tanaka, en: Carter FL, Siatkowski RE, Wohltjen H, editors. *Molecular Electronic Devices*, London: Elsevier; 369 (1988).

³⁴ I. Lavon, J. Kost, *J. Control. Release*, **54**, 1 (1998).

volumen de manera continua al variar la temperatura. Pero al irradiar los geles por encima de un valor mínimo de radiación la variación de volumen se hace discontinua³⁵.

- *Elementos bioquímicamente activos*: Enzimas o receptores pueden formar un complejo en geles bioquímicamente sensibles perturbando el equilibrio del gel e induciendo una transición de fase de hinchamiento o de colapso^{36,37}.

Existen geles que además de variar su volumen en respuesta a factores externos, lo hacen de una forma drástica característica; sufren una transición de fase. Así, un cambio infinitesimal de una variable intensiva del medio como por ejemplo la composición del disolvente, la temperatura, o el pH, puede desencadenar un enorme cambio de las propiedades extensivas del material como por ejemplo el volumen. Estas transiciones de fase en volumen o transición de colapso, implican las transiciones reversibles del gel entre dos estados diferentes, gel en estado hinchado y gel colapsado, debido a una variación en el tipo de interacción predominante en el sistema.

1.1.3. Microgeles Inteligentes

Se denominan microgeles inteligentes aquellos que presentan capacidad de respuesta frente a estímulos externos. En los últimos años los microgeles inteligentes han sido objeto de muchas investigaciones, especialmente los microgeles termosensibles^{38,39} y los microgeles sensibles a variaciones del pH^{40,41}, debido a la importancia de estas variables en el medio fisiológico.

³⁵ A. Mamade, T. Tanaka, D. Kungwachakun, M. Irie, *Macromolecules*, **3(5)**, 1517 (1990).

³⁶ T. Okano, Y.H. Bae, H. Jacobs, S.W. Kim, *J. Control. Release*, **11**, 255 (1990).

³⁷ T. Miyazaki, N. Asami, T. Uragami, *Nature*, **399**, 765 (1999).

³⁸ C.D. Jones, L.A. Lyon, *Macromolecules*, **36**, 1988 (2003).

³⁹ X. Ma, J. Xi, X. Zhao, X. Tang, *Materials Letters*, **58**, 3400 (2004).

⁴⁰ C.L. Lo, K.M. Lin, G.H. Hsiue, *J. Control Release*, **477** (2005).

⁴¹ M. Das, E. Kumcheva, *Colloid Polym. Sci.*, **284**, 1073 (2006).

Hidrogeles sensibles a la Temperatura:

La mayor parte de los polímeros experimentan un incremento de la solubilidad al aumentar la temperatura, sin embargo los polímeros que presentan una temperatura crítica de miscibilidad inferior (*lower critical solubility temperature - LCST*), sufren el fenómeno opuesto, es decir, su solubilidad disminuye al aumentar la temperatura. En el caso de estos hidrogeles se observa un colapso o deshinchamiento al rebasar la LCST. Los hidrogeles que presentan este tipo de comportamiento incorporan en su estructura química grupos de una hidrofobicidad moderada junto con grupos hidrofílicos, ya que si el polímero fuese totalmente hidrofóbico no sería capaz de hincharse en agua. Por debajo de la LCST, predominan los puentes de hidrógeno entre los grupos hidrofílicos y el agua, mientras que al aumentar la temperatura se hacen más fuertes las interacciones entre los segmentos hidrofóbicos de la cadena, obteniendo como resultado el colapso del gel. La temperatura a la que se produce la LCST depende del balance hidrofóbico-hidrofílico de la molécula y cuantos más grupos hidrofóbicos, más baja será la LCST. Una forma de controlar la LCST es copolimerizar monómeros hidrofóbicos con monómeros hidrofílicos, obteniéndose además respuesta a otros estímulos.

Un grupo interesante de polímeros, es la acrilamida y sus derivados, con sustituyentes tales como metilo, etilo o propilo en su estructura. Entre estos el más estudiado es la poli(*N*-isopropilacrilamida) (pNIPAM). Los microgeles termosensibles basados en pNIPAM, sufren colapso cuando la temperatura supera los 33 °C (LCST del pNIPAM en agua)⁴²⁻⁴⁴, debido a las características termodinámicas del polímero lineal⁴⁵. Este comportamiento de transición en volumen con la temperatura de los geles de pNIPAM, generalmente se atribuye a la ruptura y formación reversible

⁴² H. Kawaguchi, K. Fujimoto, Y. Mizuhara, *Colloid Polym.Sci.*, **270**, 53 (1992).

⁴³ K. Kratz, W. Eimer, *Ver. Bunsenges. Phys. Chem.*, **102**, 848 (1998).

⁴⁴ B.R. Saunders, H.M. Crowther, G.E. Morris, S.J. Mears, T. Cosgrove, B. Vincent, *Colloids Surfaces, A: Physicochem. Eng. Aspects*, **149**(1-3), 57 (1999).

⁴⁵ Y. Hirowaka, T. Tanaka, *J. Chem. Phys.*, **81**, 6379 (1984).

de los enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua y los grupos hidrófilos de la pNIPAM. Debido a la proximidad de la LCST de pNIPAM a la temperatura fisiológica, los derivados de este polímero se han convertido en los microgeles termosensibles que más interés han despertado en los últimos años⁴⁶⁻⁴⁹.

Otro de los hidrogeles que también presenta este tipo de comportamiento (con una LCST comprendida entre 24 °C y 37 °C según el tipo de disolvente) es la poli(acrilamida), que forma parte importante de estudio en esta tesis.

Hidrogeles sensibles al pH:

Estos hidrogeles están compuestos de matrices poliméricas con grupos funcionales ionizables ácidos o básicos que se ionizan en medio acuoso a pH y fuerza iónica dados. Esta ionización genera en la matriz polimérica cargas electrostáticas, lo que se traduce en la aparición de fuerzas repulsivas electrostáticas que originan el hinchamiento de los microgeles. Las variaciones del medio externo (pH y fuerza iónica) que hagan variar el grado de ionización de los grupos funcionales ionizables, provocan variaciones en el grado de hinchamiento de los microgeles, y por tanto en su contenido en agua. Las dimensiones del hidrogel cargado dependen, por tanto del grado de disociación, ya que cuanto mayor sea éste, mayores serán las repulsiones electrostáticas y en consecuencia las dimensiones del hidrogel. En las últimas décadas se han llevado a cabo un gran número de investigaciones sobre hidrogeles sensibles al pH y al contenido iónico^{22, 50-54}.

⁴⁶ K. Pal, A.T. Paulson, D. Rousseau *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*, 329-363 (2013),

⁴⁷ A.E. Felber, M.H. Dufresne, J.C. Leroux *Adv. Drug Del. Rev.*, **64**, (11), 979-992 (2012),

⁴⁸ M.S. Shim, Y.J. Kwon *Adv. Drug Del. Rev.*, **64**, (11), 1046-1059 (2012).

⁴⁹ G. Moad *Pol. Sci.: A Comprehensive Ref.*, **3**, 59-118 (2012).

⁵⁰ J. Ricka, T. Tanaka, *Macromolecules*, **1**, 83 (1984).

⁵¹ R.A. Siegel, A. Firestone, *Macromolecules*, **21**, 3254 (1988).

⁵² L. Wen-Fu, S. Chih-Hsuan, *J. Appl. Polym. Sci.*, **71**, 221 (1999).

Los microgeles que contienen grupos funcionales ionizables aniónicos (por ejemplo $\text{COOH} \leftrightarrow \text{COO}^-$) presentan cargas negativas en la red para valores de pH superiores al pK_a del grupo funcional en la red polimérica. Por lo tanto, el hinchamiento de las partículas de microgel se origina a valores de pH superiores al pK_a , y el colapso para valores inferiores. El hinchamiento de los microgeles aniónicos por el contrario, tiene lugar en medio *básico*, produciéndose el colapso en medio *ácido*. Los microgeles derivados del ácido acrílico, del ácido metacrílico y del poli(etilenglicol) presentan este tipo de comportamiento y han sido objeto de numerosas investigaciones⁵⁵⁻⁵⁸.

En el caso de los microgeles con grupos ionizables catiónicos, la ionización se produce para valores de pH inferiores al pK_a del grupo funcional en la red polimérica. Esto se traduce en un comportamiento inverso al de los microgeles aniónicos: las micropartículas entrecruzadas catiónicas se encuentran hinchadas a valores de pH por debajo del pK_a y colapsadas para valores superiores. Actualmente los microgeles catiónicos sensibles al pH se han convertido en sistemas interesantes con un gran potencial, estudiándose el comportamiento de estos microgeles que presentan en su estructura grupos funcionales ionizables de naturaleza catiónica derivados de la piridina^{59,60}, del imidazol⁶¹, y de derivados de aminas

⁵³ T. Tamura, S. Yoshida, Y. Miyamoto, S. Kawauchi, S.M. Komiyama, *J. Polym. Int.*, **49**, 147 (2000).

⁵⁴ I. Katime, E. Rodríguez, J. Macromol. *Sci.-Pure Appl. Chem.*, **A38**, 543 (2001).

⁵⁵ E.A. Bekturov, L.A. Bimendia, *Interpolym. Complexes, Adv. Polym. Sci.*, **43**, 100-147 (1981).

⁵⁶ M.J. Snowden, B.Z. Chowdhry, B. Vincent, G. Morris, *J. Chem Soc. Faraday Trans.*, **92(24)**, 5013 (1996).

⁵⁷ Shuiqin *et al.*, 1999

⁵⁸ P.N. Satish, A. Lyon, *Polymer Preprints*, **44(2)**, 679 (2003).

⁵⁹ J. Oxley, J. Smith, W.Y. Zheng, E. Rogers, M. Coburn, *J. of Physical Chemistry*, **101 (24)**, 4375 (1997).

⁶⁰ V.T. Pinkrah, M.J. Snowden, J.C. Mitchell, J. Seidel, B.Z. Chowdhry, G.R. Fern, *Langmuir*, **19**, 585 (2003).

⁶¹ S. Kazakov, M. Kaholek, I. Teraoka, K. Levon, *Macromolecules*, **35**, 1911 (2003)

secundarias y terciarias^{62,63}. Cabe destacar la creciente aparición de publicaciones sobre microgeles de copolímeros derivados de varios monómeros sensibles al pH del tipo piridina, como 2-vinilpiridina⁶⁴, y 4-vinilpiridina⁶⁵. Como en el caso anterior el comportamiento de estos microgeles puede ser modulado mediante la combinación con monómeros neutros y con monómeros que contengan grupos hidrofóbicos.

Una característica especial que presentan los microgeles ionizables es su capacidad para formar interacciones (principalmente electrostáticas, aunque también pueden ser enlaces por puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, etc.), con moléculas de bajo peso molecular, facilitando de esta forma la inmovilización de distintas sustancias. Por esta capacidad se pueden aplicar en campos tan interesantes como;

- i) la liberación controlada de fármacos, donde se ha observado que en la mayoría de los tejidos tumorales y de las regiones inflamadas del organismo el pH extracelular resulta un tanto inferior ($\text{pH} < 7,2$) al de los tejidos sanos ($\text{pH} = 7,4$)^{66,67}. Con este fin, surgió la idea de diseñar dispositivos compuestos por microgeles que fueran sensibles al pH y capaces de diferenciar el pH de las células enfermas del de las células sanas, para poder facilitar así la liberación del fármaco de forma localizada exclusivamente en el tejido dañado;
- ii) en el tratamiento de aguas residuales, donde estos microgeles coloidales pueden ser una alternativa a las resinas de intercambio iónico en la extracción de contaminantes tales como

⁶² J.L. Amalvy, E.J. Wanless, Y. Li, V. Michailidou, S.P. Armes, *Langmuir*, **20**, 8992 (2004).

⁶³ M.F. Leung, J. Zhu, F.W. Harris, P. Li, *Macromol. Symp.*, **226**, 177 (2005).

⁶⁴ T.J. Martín, K. Procázka, P. Munk, S.E. Webber, *Macromolecules*, **29**, 6071 (1996).

⁶⁵ K.S. Kim, B. Vincent, *Polym. J.*, **37**(8), 565 (2005).

⁶⁶ L. Tannock, D. Rotin, *Cancer Res.*, **4**, 4373 (1989).

⁶⁷ M. Stubs, P.M.J. MeSheedy, J.R. Griffiths, C.L. Bashford, *Mol. Med. Today*, **6**, 15 (2000).

- metales pesados o tensioactivos de las aguas residuales^{68,69};
- iii) o en la inmovilización de diversos materiales biológicos como proteínas, ácidos nucleicos, enzimas (punto este último objeto de parte de esta tesis).

En definitiva, la versatilidad, sus propiedades y la relativa novedad de estos microgeles, hacen de su estudio una atractiva y fructífera vía de investigación.

1.1.4. Métodos de síntesis de los microgeles

Para limitar el tamaño del gel a dimensiones coloidales, es necesario controlar el crecimiento de las moléculas entrecruzadas durante la síntesis. Este control se puede realizar restringiendo el volumen de polimerización y entrecruzamiento a un volumen de tamaño coloidal. Existen distintos métodos de síntesis de microgeles:

i) Polimerización por emulsión: Los componentes básicos en la polimerización en emulsión son agua, monómero o monómeros, agente emulsionante o tensioactivo e iniciador. En la emulsión convencional, los monómeros son insolubles o difícilmente solubles en el medio de polimerización y se encuentran emulsionados gracias a la adición de un tensioactivo del tipo aceite en agua. El agente emulsionante rebaja la tensión superficial y está constituido por cadenas hidrocarbonadas hidrófobas las cuales presentan al final una cabeza hidrófila. Disponen sus grupos hidrófilos en contacto con las moléculas de agua y sus cadenas hidrocarbonadas dirigidas hacia el centro formando agregados esféricos conocidos como micelas. Las micelas se forman a partir de una concentración crítica de tensioactivo, la concentración micelar crítica (CMC)⁷⁰. Para

⁶⁸ H.M. Crowther, G.E. Mooris, B. Vincent, N.G. Wright, S. Barany, *Role Interf. Environm. Protect.*, **169** (2003).

⁶⁹ R. Kanazawa, K. Mori, H. Tokuyama, H. Kawaguchi, *Colloid Polym. Sci.*, **273**, 339 (2004).

⁷⁰ Inchausti, I., Sasia, P.M. y Katime, I. *Journal of Materials Science.*, **40**, 4833 (2005).

llevar a cabo una polimerización en emulsión, se disuelve el agente tensioactivo en agua, el cual forma las micelas, luego se adiciona el monómero, del cual una parte se introduce dentro de las micelas, con otra parte se forman gotitas de monómero dispersas en el medio acuoso y una pequeña parte del monómero disuelto en el agua. Luego se agrega un iniciador soluble en agua, el cual empieza a descomponerse y genera radicales libres, los cuales entran a las micelas hinchadas para reaccionar con el monómero que esta dentro de ellas y así iniciar la reacción de polimerización. La reacción de polimerización termina dentro de una partícula cuando entra otro radical o cuando se transfiere la cadena a un monómero y el nuevo radical generado sale de la partícula.

ii) Polimerización en microemulsión: Las microemulsiones son fases fluidas, microestructuradas, isotrópicas, ópticamente transparentes o traslúcidas, en equilibrio termodinámico, que contienen dos fluidos inmiscibles (generalmente agua y aceite) y tensioactivos⁷¹. Por el contrario las emulsiones se caracterizan por tener un aspecto lechoso, ser opacas y termodinámicamente inestables.

La mayor diferencia entre emulsión y microemulsión viene dada por la cantidad de tensioactivo necesario para estabilizar el sistema, siendo mucho mayor en el caso de las microemulsiones ($\approx 10\%$ de la masa total). Para llevar a cabo una polimerización en microemulsión, al igual que en el caso de emulsión, se disuelve un agente tensioactivo en agua, el cual forma las micelas, luego se adiciona el monómero, pero en el caso, la cantidad de tensioactivo es unas 10 a 15 veces mayor que en el caso de emulsión, por lo que el monómero sólo se reparte entre las micelas y una pequeña cantidad queda solubilizado en la fase acuosa. Luego se agrega un iniciador soluble en agua, el cual empieza a descomponerse y genera radicales libres, los cuales entran a las micelas hinchadas para reaccionar con el

⁷¹ K.L. Mittal, *Micellization, Solubilization and Microemulsions*, Plenum Press Inc. (1977).

monómero que esta dentro de ellas y así iniciar la reacción de polimerización.

iii) Polimerización en disolución: La polimerización en disolución es un tipo de técnica convencional de polimerización en sistemas homogéneos que se utiliza a nivel industrial ya que permite una buena evacuación del calor de reacción⁷². En este tipo de polimerización los reactivos y el iniciador se encuentran perfectamente disueltos en el medio de reacción formando una única fase homogénea.

iv) Polimerización por precipitación: Este tipo de polimerización no precisa de sustancias estabilizadoras tipo tensioactivos. Esta polimerización se caracteriza por tener lugar en un medio que resulta ser buen disolvente de los monómeros, pero que sin embargo es un pobre o mal disolvente del polímero resultado de la polimerización^{73,74}.

En la polimerización por precipitación se parte de un sistema homogéneo de una sola fase en la que tanto los monómeros como el iniciador se encuentran perfectamente disueltos en el medio de reacción.

v) Polimerización radicalaria: Entre los procedimientos utilizados para la síntesis de polímeros, uno de los más importantes es el de polimerización radical que se basa en la ruptura de un doble enlace de un monómero insaturado mediante la acción de un radical libre y la posterior reacción en cadena con sucesivas incorporaciones de moléculas de monómero al radical activo dando lugar finalmente al polímero.

El esquema cinético clásico más sencillo que se aplica a las reacciones de homopolimerización radical incluye las etapas de iniciación, propagación y terminación. El proceso de iniciación en presencia de un iniciador de radicales se supone que se realiza en dos etapas: en la primera, lenta, se descompone el

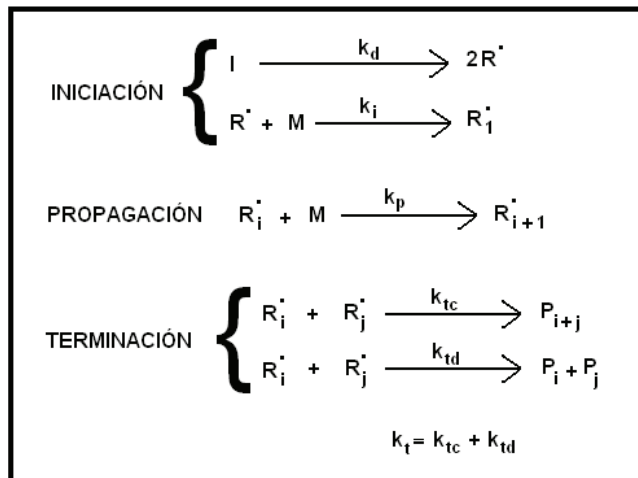
⁷² I. Katime, *Química Física Macromolecular*, Servicio Editorial UPV/EHU, Bilbao, (1994).

⁷³ R.S. Frank, J.S. Downey, H.D.H. Stöver, *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.*, **36**, 2223 (1998).

⁷⁴ C. Bunyakan, H. Hunkeler, *Polymer*, **40**, 6213 (1999).

iniciador I, en radicales, R^\cdot , y en la segunda se forman los primeros radicales carbonados por reacción de aquellos con las moléculas de monómero. En cuanto a las etapas sucesivas de la propagación, formación de los radicales polímeros, se supone que todos tienen la misma constante de velocidad k_p , ya que la reactividad de los radicales se considera que es independiente de la longitud de la cadena. La etapa de terminación implica la combinación de radicales o su desproporción y para cada una de estas dos posibilidades la constante de velocidad es distinta. Sin embargo, cuando no se precisa distinguir los dos mecanismos, la constante de velocidad de terminación se suele expresar por k_t , constante global.

En el Esquema 1.1 se representan las ecuaciones químicas que corresponden a cada uno de los procesos comentados:



Esquema 1.1.: Reacciones química de los procesos de polimerización radicalaria

Las ecuaciones de velocidad de las tres etapas de la polimerización pueden escribirse en función de las concentraciones de las especies implicadas y de las constantes de velocidad.

El uso de hidrogeles de metacrilato en biomedicina y biotecnología ha experimentado un notable progreso en las pasadas décadas, después del trabajo pionero desarrollado en

los años sesenta por Wicheterle y Lim⁷⁵. Los monómeros de metacrilato consisten en un grupo alquilo, un grupo de ester de acrilato, y un grupo carboxilo funcional, que puede reaccionar con una amplia variedad de monómeros y moléculas funcionales, proporcionando al polímero cadenas flexibles. Los alquil-metacrilatos son líquidos claros y volátiles, ligeramente solubles en agua y muy solubles en alcoholes, éteres, y solventes orgánicos⁷⁶⁻⁷⁸. Los hidrogeles de metacrilato permiten la interconexión de sus cadenas poliméricas lineales con agentes entrecruzantes, estableciendo una red tridimensional de fuertes uniones químicas. El principio de polimerización requiere la activación radicalaria de los monómeros de forma libre, iónica, térmica o fotoquímica⁷⁹⁻⁸¹. Hay varios tipos de la polimerización usada en la preparación de hidrogeles de metacrilato: polimerización de adición (polimerización radicalaria libre) iniciado por iniciadores de radicales libres como 2-2'-azino-bis [3-etil-benzotiazolinina-6-ácido sulfónico] (AIBN) o dimetoxil-2-fenilacetofenona (DMPP)^{80,82-85}, y polimerización en bloque, usada preparar bloques monolíticos^{1-2, 86-88}.

⁷⁵ O. Wichterle, D. Lim, *Nature*, N.Y. St Martin's Press Inc. 117 (1960).

⁷⁶ P.S. Wright, *J. Dent.*, **9**, 210 (1981).

⁷⁷ M. Braden, R.L. Clarke, J. Nicholson, S. Parker, *Polymeric Dental Materials. Berlin: Springer*.101 (1997).

⁷⁸ S. Parker, D. Martin, M. Braden, *Biomaterials.*, **19(18)**, 1695 (1998).

⁷⁹ C. Arias, M.M.C. López-Glez, M. Fdez-García, J.M. Barrales-Rienda, E.L. Madruga, *Polymer.*, **34(8)**, 1786 (1993)

⁸⁰ L. Doretto, D. Ferrara, S. Lora, G. Palma, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **29**, 67 (1999).

⁸¹ A.B. Hasan Susan, T. Kaneko, A. Noda, M. Watanabe, *J. Am. Chem. Soc.*, **127** 4976 (2005).

⁸² G. Bayramoğlu, Y. Kaçar, A. Denizli, M.Y. Arica, *J. Food. Eng.*, **52**, 367 (2002).

⁸³ T. Konno, J. Watanabe, K. Ishihara, *Biomacromolecules.*, **5(2)**, 342 (2004).

⁸⁴ L.S. Bean, L.Y. Heng, B.M. Yamin, M Ahmad, *Thin Solid Films.*, **477**, 104 (2005).

⁸⁵ L.S. Bean, L.Y. Heng, B.M. Yamin, M Ahmad, *Bioelectrochemistry.*, **65**, 157 (2005).

⁸⁶ S. Brahim, D. Maharaj, D. Narinesingh, A. Guiseppi-Elie, *Anal. Lett.*, **35(5)**, 797 (2002).

⁸⁷ S. Brahim, D. Narinesingh, A. Guiseppi-Elie, *Biosens. Bioelectron.*, **17**, 973 (2002).

En esta tesis la preparación de microgeles utilizando una polimerización radicalaria, se ha llevado a cabo polimerizando el monómero junto con el agente entrecruzante NN'-metilen-bis-acrilamida. La reacción de polimerización radicalaria se inicia con persulfato de amonio (PSA), que se disocia formando NH_4^+ y $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$. Esta última especie es capaz, en medio acuoso, de homolizarse generando 2 radicales libres, $\text{OH}\bullet$ y $\text{SO}_4\bullet$, proceso que se ve acelerado por el NNN'-tetra-metil-etilen-diamina (TEMED). Los radicales libres dan lugar a un ataque electrófilo sobre el carbono adyacente al grupo imidazol o adyacente al grupo carbonilo. Esto genera la formación del radical R-monómero que en la fase de crecimiento reacciona con otro monómero de la disolución dando lugar a otro radical formado por 2 moléculas de monómero. El proceso se repite n veces generando un polímero lineal.

1.1.5. Aplicaciones de los microgeles

A continuación se detallan algunas de las aplicaciones más comunes en las que se están empleando actualmente estos materiales.

- *Recubrimientos*: Los microgeles han encontrado aplicación en la industria de los recubrimientos de cables debido a su capacidad para mejorar las propiedades reológicas de los fluidos (viscosidad o fluidez)^{89,90}, así como por presentar excelentes propiedades para la formación de películas^{21,91}.
- *Tintas*: Debido a su elevada área superficial, es posible unir covalentemente moléculas de tintes orgánicos a la superficie de los microgeles para obtener pigmentos orgánicos⁹². También se han incluido dispersiones de microgeles en tintas de

⁸⁸ S. Brahim, D. Narinesingh, A. Guiseppi-Elie, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **18**, 69 (2002).

⁸⁹ S. Porter, B.N. McBane, *US Patent* 4 025 171, (1977).x

⁹⁰ A.J. Backhouse, *US Patent* 4 404 00 y 4 220 679, (1983).

⁹¹ C.W.A. Bromley, *J. Coat. Techn.*, **61**, 768 (1989).

⁹² Nippon Paint Co., Jap. Unexam Patent 62/288632 (1988).

impresión con propiedades de secado y de resistencia al agua mejoradas^{93,9}

- *Biomedicina*: Los microgeles se están utilizando como sustratos transportadores de enzimas, proteínas, anticuerpos y genes, ya que estos agentes pueden unirse covalentemente a su superficie⁹⁴.

Dentro de la biomedicina, los microgeles están adquiriendo especial interés en el diseño de dispositivos para la liberación controlada de fármacos⁹⁵, debido a que además de contar con las propiedades idóneas de los hidrogeles, cuentan con dimensiones coloidales, que permiten penetrar a través por ejemplo del sistema endotelial⁹⁶ y permanecer largos periodos de tiempo en sangre. Debido a esta alta permanencia en sangre, los microgeles pueden tener aplicaciones terapéuticas potenciales para el tratamiento del cáncer, ya que los agentes citotóxicos encapsulados en estas partículas podrían ser conducidos hasta los tumores, minimizando así su efecto tóxico en tejidos sanos^{97,98}.

Los microgeles son excelentes portadores de biomoléculas, que pueden estar inmovilizadas en su interior, por atrapamiento físico. Estos sistemas permiten encapsular principios activos lábiles⁹⁹⁻¹⁰², tales como

⁹³ H. Onishi, *Jpn. Kokai Tokkyo Kho JP 03 56573* [91 56573] (IPC C09D-11/00) (1991).

⁹⁴ W. Funke, O. Okay, B. Joss-Müller, *Adv. Polym. Sci.*, **136**, 139 (1998).

⁹⁵ J.K. Oh, R. Drumright, D. J. Siegwart, K. Matyjaszewski, *Progr. Polym. Sci.*, **33**, 448 (2008).

⁹⁶ E. Allemán, E. Doelker, R. Gurny, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **39**(1), 13 (1993).

⁹⁷ D. Sharma, T.P. Chelvi, J. Kaw, K. Chakravorty, T.K. De, A. Maitra, R. Ralhan, *Oncol. Res.*, **8**(7), 281 (1996).

⁹⁸ L. Mu, S.S. Feng, *J. Control Release.*, **86**, 33 (2003).

⁹⁹ O.Z. Fisher, A. Khademhosseini, *E. Mat. Sci. & Techn.*, 1-9 (2008),

¹⁰⁰ N. Elvassore, M. Baggio, P. Pallado, A. Bertucco, *Biotechnol Bioeng.*, **73**(6), 449 (2001).

¹⁰¹ P.A. Raffin, V. Weiss, O. Mertins, N. Pesce da Silveira, S. Staniscuaski, *Eur J Pharm Sci.*, **16**(4-5) 305 (2002).

¹⁰² C. Cheng-Shu, T. Cherng-Wen, Y. Yi-Yan, W. Ling, S. Moochhala. *Biomaterials.*, **24**, 1271 (2003).

proteínas, enzimas y péptidos, confiriéndoles gran estabilidad estructural y funcional durante largos períodos de tiempo^{103,104}. La inmovilización de enzimas, es considerado como un factor clave en la fabricación de biosensores, por esta razón una aplicación novedosa de los microgeles es su utilización como sistemas de inmovilización enzimáticos y su uso como componente biológico en el diseño de biosensores.

Los microgeles son pues, materiales versátiles que se espera que en los próximos años jueguen un papel importante en el control de la polución, así como en la industria de los recubrimientos y por supuesto en la industria farmacéutica.

1.2. Biosensores

La necesidad de llevar a cabo determinaciones analíticas de manera rápida, selectiva y con elevada sensibilidad ha dado lugar a la aparición y desarrollo de los biosensores. Un biosensor puede definirse como un dispositivo integrado capaz de proporcionar información analítica cuantitativa o semicuantitativa, que utiliza un elemento de reconocimiento biológico (enzima, anticuerpo, ácido nucleico, etc) en íntimo contacto con un elemento de transducción y que permite la detección rápida y fácil de las interacciones moleculares entre el elemento de reconocimiento y el analito, procesando la señal generada por esas interacciones, transformándola en información específica. Esta detección ocurre a dos niveles: i) las propiedades físico-químicas de la macromolécula cambian debido a la unión, produciéndose la variación de una o varias de estas propiedades que detecta el transductor (pH, transferencia de electrones, de calor, cambio de potencial, de masa, variación de las propiedades ópticas, etc.), y ii) se produce una señal macroscópica que permite detectar este cambio, transformando la respuesta del elemento de reconocimiento en una señal electrónica indicativa de la presencia del analito sometido a estudio o proporcional a su

¹⁰³ B. Benas, M.A. Benoit, O. Poulain, *Vaccine*, **18**, 1495 (2000).

¹⁰⁴ G.E. Hildebrand, J.W. Tack, *I.J. Pharm.*, **196**, 173 (2000).

concentración en la muestra. La Figura 1.1 muestra un esquema de la estructura general de un sensor químico, donde se distingue la etapa de reconocimiento molecular, de transducción y de procesamiento de datos.

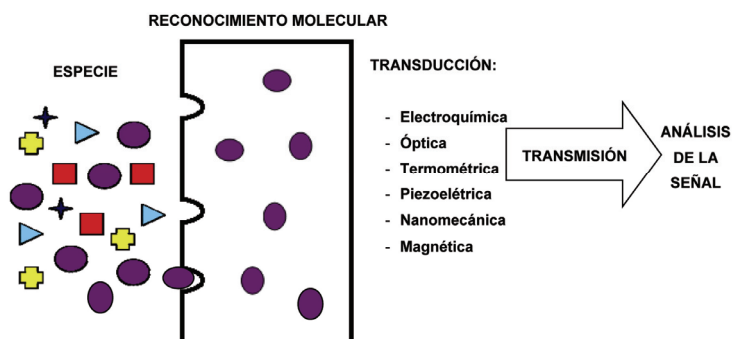


Figura 1.1.: Modelo general de un sensor químico en el que se distinguen tres bloques: el reconocimiento molecular, la transducción y el procesamiento de los datos

El término biosensor aparece en la literatura científica a finales de los años 70, aunque fue en 1962 cuando Clark¹⁰⁵, reconocido posteriormente como padre del concepto de biosensor, diseñó el primer biosensor basado en la inclusión de la enzima glucosa oxidasa en un electrodo de oxígeno, pudiendo determinar la concentración de glucosa en sangre a partir de la disminución de la concentración de oxígeno. Basándose en este electrodo, y con el deseo de aumentar el número de sustancias analizables en el cuerpo humano, describió la manera de hacer más "inteligentes" estos sensores electroquímicos mediante el atrapamiento de transductores enzimáticos en su superficie. Bautizado con el nombre de electrodo enzimático, consistía en la inclusión de la enzima glucosa oxidasa en la superficie de un electrodo de oxígeno con una membrana de diálisis. Este sensor permitía relacionar directamente la concentración de glucosa con la disminución que se produce en la concentración de oxígeno. Posteriormente, Guilbault y Montalvo¹⁰⁶ en 1969 desarrollaron el primer electrodo enzimático potenciométrico basado en la inmovilización de

¹⁰⁵ L.C Clark, C. Lyons, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **102**, 29 (1962).

¹⁰⁶ G.G. Guilbault, J.J. Montalvo, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 2164 (1969).

la enzima ureasa sobre un electrodo selectivo de amonio. Estas ideas acabaron plasmadas en el lanzamiento comercial en 1975 de un dispositivo para el análisis de glucosa basado en la detección amperométrica de peróxido de hidrógeno, siendo el primero de los numerosos biosensores comercializados posteriormente.

El desarrollo de los biosensores desde entonces ha estado centrado principalmente en el campo del diagnóstico clínico. Debido al gran éxito de los biosensores para glucosa, el interés se ha extendido a los campos medioambiental, químico, farmacéutico y militar así como el de la seguridad alimentaria para la detección de compuestos contaminantes, alérgenos, antinutrientes, toxinas y microorganismos patógenos.

Los biosensores poseen una serie de características destacando su alta sensibilidad y especificidad, bajo coste, manejo sencillo y tiempo de análisis corto, además permiten realizar análisis en tiempo real, pudiendo automatizarse y miniaturizarse^{95,96,103,107}.

1.2.1. Características de la respuesta del Biosensor

En las múltiples aplicaciones de los biosensores es deseable que estos dispositivos cuenten con las siguientes características:

1. Alta *sensibilidad* para el análisis de ciertos analitos
2. Alta *selectividad* para que el dispositivo interaccione exclusivamente con el compuesto de interés y no con otros de propiedades similares. Se consigue mediante elementos de reconocimiento muy específicos.
3. Alta *fiabilidad*. Los sistemas de transducción se diseñan de manera que no puedan ser alterados (o lo sean mínimamente) por la muestra y no tengan problemas de ruido de fondo.

¹⁰⁷ S.B. Adeloju, A.N.Moline, *Biosens. Bioelectron.*, **16(3)**,133 (2001).

4. *Tiempo de vida largo*. La estabilidad química, física y mecánica del elemento de reconocimiento condiciona su duración
5. *Bajo coste de producción*. En general estos biosensores se diseñan para que se permita la fabricación a escala industrial, así como su incorporación a sistemas “on line”.
6. *Tiempo de análisis corto* que posibilite la medida de forma rápida.
7. *Pretratamiento* de la muestra *innecesario o mínimo* lo que supone un ahorro de tiempo, materiales, reactivos y una menor incertidumbre.
8. *Manejo sencillo*, que no requiera personal cualificado.
9. Realización del *análisis en tiempo real*. Esta característica es especialmente interesante en el control de procesos, ya que permite controlar los parámetros deseados de forma automática e inmediata.
10. *Portabilidad* para la realización de análisis *in situ*.
11. *Automatizabilidad*. Para facilitar su integración en sistemas on line y en sistemas de control de procesos industriales.
12. *Miniaturizabilidad*. Aplicables a ensayos donde el tamaño físico del dispositivo, el volumen de la muestra o la localización de la medida son factores limitantes.
13. *Pocos requerimientos operativos* y de almacenamiento que faciliten su empleo y no supongan un coste adicional.
14. Con capacidad *multi-análisis*. Para llevar a cabo la detección de diferentes analitos de forma simultánea.

1.2.2. Clasificación de los Biosensores

La clasificación de los biosensores puede realizarse desde varios puntos de vista, así se base en el mecanismo de interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito,

en la metodología de detección, en la naturaleza del elemento de reconocimiento o en el sistema de transducción.

Haciendo una clasificación basada en la naturaleza del proceso biológico, en la que pueden distinguirse dos grandes grupos:

Biosensores catalíticos, los cuales se basan en la utilización de catalizadores biológicos que median en una reacción química, en la que intervienen uno o varios sustratos, para generar uno o varios productos. Estos biocatalizadores pueden ser enzimas, microorganismos, células completas y tejidos animales o vegetales.

Biosensores de afinidad, los cuales se basan en la interacción del analito de interés con el elemento de reconocimiento, sin que intervenga transformación catalítica. La interacción implica la modificación de un equilibrio formándose un complejo analito-receptor. Entre estos biosensores se encuentran los inmunosensores (que utilizan anticuerpos como componentes de estos sensores de bioafinidad), los genosensores (que utilizan ácidos nucleicos) y los basados en quimiorreceptores (que utilizan receptores celulares específicos de membranas celulares)

En la Figura 1.2 se muestra un esquema de un biosensor con material biológico inmovilizado.

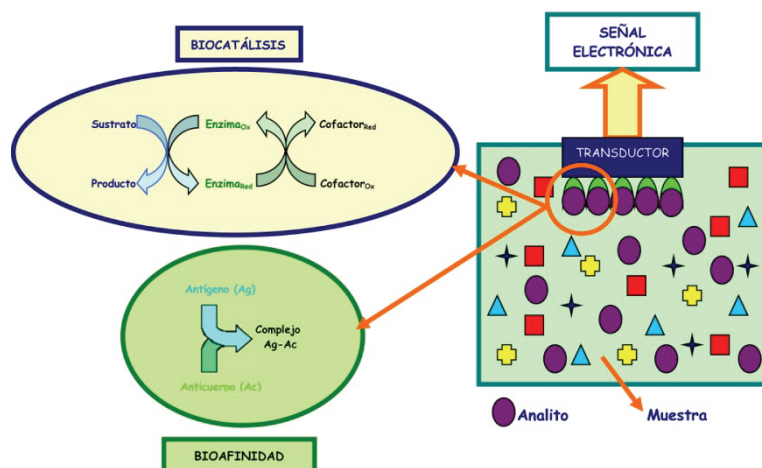


Figura 1.2.: Esquema de un biosensor con material biológico inmovilizado

Respecto a la metodología para la detección de la interacción y la estimación de su magnitud puede utilizarse un sistema de **detección directa** de la interacción receptor-analito, basada en los cambios de masa que tienen lugar en la superficie receptora, o bien en los cambios de las propiedades ópticas o electroquímicas producidos por dicha unión, es decir una detección sin necesidad de marcaje. Como contrapartida, si se recurre al marcaje de alguno de los elementos de reconocimiento o de alguna molécula que compita con el analito por su unión con el receptor, tendremos una **detección indirecta**.

<i>TIPO DE INTERACCIÓN</i>	<i>DETECCIÓN DE LA INTERACCIÓN</i>
— Catalítica	— Directa
— De afinidad	— Indirecta

<i>ELEMENTO DE RECONOCIMIENTO</i>	<i>SISTEMA DE TRANSDUCCIÓN</i>
— Proteínas	— Electroquímico
— Ácidos nucleicos	— Óptico
— Lípidos	— Termométrico
— Elementos supramoleculares	— Piezoeléctrico
— Elementos naturales	— Nanomecánico
— Elementos biomiméticos	— Magnético

Una tercera clasificación, es la que se basa en el fundamento del transductor. El sistema de transducción es el elemento que convierte las variaciones de las propiedades físico-químicas producidas por la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito en una señal que puede ser amplificada, almacenada y registrada. Existen distintos tipos de transductores en función de las propiedades físicas en las que se fundamenta la medida, por lo que atendiendo a este criterio, los biosensores pueden clasificarse en:

a) Electroquímicos y/o Eléctricos.

Los transductores electroquímicos transforman la señal que se produce por la interacción entre el sistema de reconocimiento y el analito en una señal eléctrica. Proporcionan información analítica cuantitativa o semicuantitativa específica. El elemento de reconocimiento biológico y el elemento de transducción deben estar en contacto directo. Se diferencian cinco tipos:

i) *Amperométricos*: Los sensores amperométricos se basan en la medida de la intensidad de corriente resultante de la oxidación o reducción de una especie en un electrodo sometido a un potencial constante. La elección adecuada de este potencial aporta cierta selectividad electroquímica, que a menudo resulta insuficiente, por lo que suele ser necesario modificar la superficie de los electrodos (química o biológicamente), para aumentar la selectividad y la sensibilidad de la medida. La mayor parte de los biosensores amperométricos utilizan las enzimas del grupo oxidoreductasas, debido a que los productos consumidos o generados durante el proceso de oxidación o reducción, suelen ser fácilmente determinados amperométricamente. En la Figura 1.3 se muestran algunos de los sensores amperométricos con distintos elementos biológicos de reconocimiento.

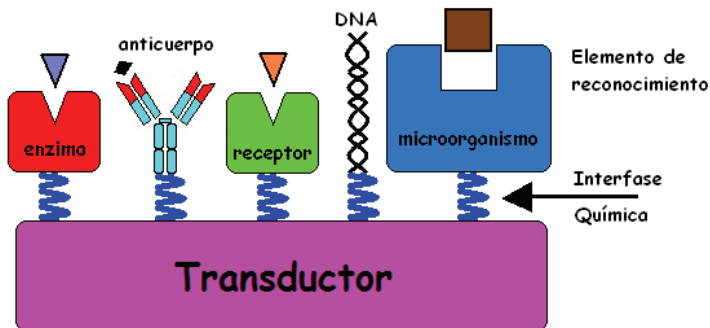


Figura 1.3.: Características analíticas de algunos sensores amperométricos con inmovilización en membranas

Para realizar estas medidas se utilizan sistemas de tres electrodos. El electrodo de trabajo es aquel sobre el cual se mide el paso de corriente una vez se ha fijado una diferencia de

potencial entre el electrodo de trabajo y electrodo de auxiliar, actuando este último como un contraelectrodo para cerrar el circuito eléctrico. Se necesita también un potencióstato el cual, mediante el electrodo de referencia, mantiene constante el potencial aplicado sobre el electrodo de trabajo. El electrodo de referencia acostumbra ser de Ag/AgCl, aunque también puede ser Electrodo de Calomelanos Saturado (ECS), mientras que el de trabajo y auxiliar son de materiales conductores e inertes, como metales nobles, derivados de carbono y polímeros conductores.

La relación entre la proporcionalidad que existe entre la concentración de la especie electroactiva determinada y la corriente eléctrica registrada al oxidarse o reducirse sobre la superficie del electrodo polarizado se comporta según el siguiente modelo:

$$I = nFAD_o \frac{\delta(C_o(0,t))}{\delta x} \quad [8]$$

donde A es el área del electrodo de trabajo, D_o y C_o son el coeficiente de difusión y la concentración del analito, respectivamente y x representa la distancia de la doble capa.

En el caso de que la solución esté en agitación constante, se puede considerar que x se mantiene constante y se corresponde con el tamaño de la capa de difusión (δ). Se simplifica así la ecuación anterior, obteniéndose una relación lineal entre la intensidad medida y la concentración del analito:

$$I = \frac{nFAD_o}{\delta} C_o \quad [9]$$

ii) *Potenciométricos*: la utilización de transductores potenciométricos se basa en los electrodos selectivos de iones. Estos electrodos, caracterizados por una transferencia de carga a través de una interfase en condiciones de corriente cero y en conjunción con diversas enzimas, como marcadores de la reacción de afinidad, permiten su utilización para la detección de distintos analitos.

Las medidas potenciométricas consisten en la determinación de una diferencia de potencial en condiciones de circuito abierto entre un electrodo de trabajo y uno de referencia. La diferencia de potencial medida entre los electrodos se relaciona con la concentración del analito de acuerdo con la ecuación de Nernst, en la situación teórica de ausencia de iones interferentes.

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln(a_i) \quad [10]$$

Esta ecuación relaciona cuantitativamente el potencial del electrodo y la actividad del ion, E^0 se denomina potencial estándar del electrodo y es el potencial cuando la actividad de la sustancia electroactiva es igual a la unidad.

iii) *Conductimétricos o Impedimétricos*: El sistema conductimétrico emplea dos pares de pequeños electrodos de conductividad en configuración plana. Entre uno de los pares se coloca una membrana con el enzima que ha sido inmovilizado mientras que entre el segundo par se pone una membrana blanca, carente de enzima. El aparato mide la conductividad a través de cada par de electrodos por turno, con una frecuencia fija. En presencia del sustrato enzimático se pueden registrar cambios de conductividad en los alrededores de la membrana, los cuales dependen de la concentración del sustrato. Midiendo la diferencia de respuesta entre ambos pares de electrodos se puede compensar la conductividad propia de la muestra biológica, usando los electrodos blancos como referencia.

La conductancia viene determinada por la ecuación:

$$L = \frac{Ak}{l} \quad [11]$$

siendo l la longitud de la celda, A el área de sección transversal y κ la conductividad o conductancia específica. Puesto que esta conductividad específica depende del número de cargas iónicas presentes, se normaliza

dividiendo por la concentración de estos iones, obteniendo así la conductividad molar:

$$\Lambda = \frac{k}{C} \quad [12]$$

siendo k la conductividad específica ($S \text{ cm}^{-1}$), y C la concentración de iones (mol cm^{-3}). La conductividad es directamente proporcional a la concentración de iones en solución.

Las medidas de resistividad en corriente continua son las más comunes para el funcionamiento de estos biosensores, aunque para registrar medidas de impedancia para caracterizar algunos líquidos y/o superficies de electrodos modificadas se utiliza corriente alterna.

iv) *De carga iónica o efecto de campo (ISFET)*: Su funcionamiento se basa en el control del flujo de cargas que se produce entre dos electrodos semiconductores tipo n (fuente y drenaje) situados sobre la superficie de un elemento semiconductor tipo p. Para cerrar el circuito eléctrico se sitúa entre los dos anteriores un tercer electrodo de naturaleza metálica (puerta). El electrodo metálico está aislado de los electrodos semiconductores, mediante una fina capa de óxido de silicio (SiO_2), pero puede influir en la corriente eléctrica (I_{df}) existente entre el drenaje y la fuente, aunque sólo de manera electrostática. El campo eléctrico requerido para ello es proporcionado por un voltaje externo (V_{pf}) entre la puerta y la fuente. Dicho de otro modo, la corriente I_{df} está directamente relacionada con el voltaje V_{pf} .

El electrodo metálico puede remplazarse por una capa de un material sensible a iones (protones), como p.e. óxido de aluminio (Al_2O_3), el óxido de tántalo (Ta_2O_5) o el nitruro de silicio (Si_3N_4). En presencia de estos iones se produce un cambio en el voltaje V_{pf} entre la puerta y la fuente que conlleva un cambio también en la corriente I_{df} entre el drenaje y la fuente, que estará directamente relacionada con el pH del medio. Los dispositivos ISFET pueden

transformarse fácilmente en biosensores, inmovilizando una enzima sobre la superficie del sensor. La reducción de las dimensiones de los electrodos puede obtenerse mediante la utilización de dispositivos semiconductores químicamente sensibles. Además de su pequeño tamaño, estos dispositivos pueden beneficiarse de las técnicas estandarizadas de fabricación a gran escala y utilizadas en la industria de semiconductores.

v) *Transductores potenciométricos de luz direccionada (LAPS)*: Existe un tipo de sensor de reciente desarrollo consistente en una combinación entre los sistemas de transducción óptico y electroquímico. Son sensores químicos constituidos por un electrolito, un aislante y un semiconductor de silicio. Estos sensores permiten detectar cambios de pH en las disoluciones, lo que se puede aplicar en la monitorización de algunas reacciones enzimáticas o alteraciones celulares que producen variaciones en el pH del medio.

b) Ópticos

Los transductores ópticos se basan en la medición de las variaciones que se producen en las propiedades de una radiación electromagnética como consecuencia de la interacción física o química entre el analito y el elemento biológico de reconocimiento del biosensor. Las bases físicas de este tipo de sensores son los cambios que ocurren en absorción, luminiscencia, dispersión o índice de refracción cuando la luz incide en las superficies donde se encuentra el elemento de reconocimiento. El sistema de medida básico consiste en una fuente de radiación electromagnética, el elemento sensor y el detector. Se diferencian métodos de detección directa sin necesidad de marcaje o indirecta, en la que es necesario utilizar marcaje. Estos transductores pueden además acoplarse a elementos de reconocimientos catalíticos o de afinidad.

Los transductores ópticos son muy variados en función de las propiedades, incluyendo así Optrodos (o sensores de

fibra óptica), sensores de onda evanescente, sensores de resonancia de plasmones (SPR) y resonancia de espejos.

i) *Optrodos*: Basados en fibras ópticas, consiste en una fibra óptica en el que en uno de cuyos extremos se inmoviliza el elemento de reconocimiento, que puede ser de tipo biocatalítico o de bioafinidad y en el otro extremo se sitúa el elemento de detección. En este tipo de dispositivos, es necesaria la utilización de marcadores ópticamente activos como colorantes sensibles al pH o a la concentración de oxígeno, moléculas fluorescentes, y en menor medida, moléculas bio o quimioluminiscentes. Como consecuencia de la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento se produce un cambio cuantificable en las propiedades ópticas del transductor (absorción, fluorescencia, índice de refracción, bioluminiscencia o dispersión) que llega a través de la fibra óptica al detector.

ii) *Ondas evanescentes*: Se basa en un fenómeno conocido como reflexión interna total de fluorescencia, que consiste en la absorción y emisión de fotones. La radiación que viaja a través de una guía de ondas por reflexión interna total crea un campo electromagnético denominado campo electromagnético evanescente, que puede penetrar a una determinada distancia desde la superficie de la guía dependiendo del ángulo de incidencia en la interfase y la longitud de onda de la radiación de excitación utilizada. En este método de detección, los cambios superficiales de índice de refracción generados como consecuencia de la reacción de reconocimiento molecular, son detectados gracias a que el campo evanescente de los modos guiados actúa como sonda. De esta forma, determinando la variación experimentada por las condiciones de guiado como consecuencia de la alteración local del índice de refracción, será posible cuantificar la cantidad de analito involucrada en la reacción de reconocimiento molecular. Se necesita utilizar moléculas con propiedades fluorescentes. Este tipo de dispositivos son ideales para la detección de analitos mediante métodos de afinidad, ya que se minimiza la interferencia de otras sustancias presentes en la muestra, sin que además sea necesaria la utilización de ningún tipo de marcador molecular, lo que permite una detección directa, rápida y selectiva del analito.

iii) *Resonancia de plasmones superficiales (SPR)*: Las ondas de plasmón superficial (plasmones), son oscilaciones colectivas de electrones libres en la interfase plana entre dos medios cuyas constantes dieléctricas poseen partes reales de signos opuestos (generalmente un metal y un dieléctrico). La SPR es un fenómeno óptico que ocurre cuando una luz polarizada se dirige desde una capa de mayor índice de refracción (un prisma) hacia una de menor índice de refracción, que en este caso es una capa de un metal conductor (generalmente de oro o de plata), situada entre el prisma y la muestra. La luz que incide en la interfase entre el metal y el prisma provoca la excitación de un plasmón superficial para un determinado ángulo de incidencia de dicha luz, llamado ángulo de resonancia. El ángulo de resonancia depende del índice de refracción del medio adyacente a la lámina metálica, por lo que las variaciones que se produzcan en el mismo van a ser detectadas como desplazamientos en el ángulo de resonancia, relacionándose con las variaciones de masa producidas en la superficie del sensor. La interacción por tanto, entre el analito y el elemento de reconocimiento, podrá cuantificarse directamente sin necesidad de recurrir al empleo de marcadores ni de reactivos adicionales.

iv) *Resonancia de espejos*: Es una variación de la resonancia de plasmones superficiales, en el cual se utilizan filtros polarizados para bloquear la luz reflejada internamente. Consiste en una delgada capa de óxido de silicio (SiO_2) de bajo índice de refracción tapizado con otra capa, más delgada de óxido de titanio (TiO_2) de alto índice de refracción. El haz de luz se dirige hacia la capa de silicio con un ángulo de incidencia determinado (ángulo de resonancia), se introduce en el medio de elevado índice de refracción. En esta capa la radiación experimentará una serie de reflexiones, generando un campo evanescente que se extiende hacia la zona donde se deposita la muestra. La variación en el índice de refracción en la superficie de la zona del sensor, debido a la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento, producirá un cambio en el ángulo de resonancia, el cual puede relacionarse con la concentración del analito.

c) Termométricos o Calorimétricos

La producción de calor es una propiedad general de muchas reacciones enzimáticas. Los transductores termométricos se basan en la detección del calor generado en las reacciones enzimáticas, que se puede relacionar con la concentración de analito. Estos cambios de temperatura normalmente se determinan por medio de termistores a la entrada y a la salida del dispositivo en el que se encuentran inmovilizadas las enzimas. La alta resistividad de los materiales de constitución de los termistores, mezclas de óxidos metálicos con semiconductores cristalinos, les confiere una rápida respuesta debido a su pequeño tamaño y tener una capacidad calorífica reducida. La resistencia de un termistor es función de la temperatura, lo cual se ocupa como principio para la transducción. La enzima inmovilizada se coloca directamente sobre el termistor de trabajo. La liberación o el consumo de calorías originadas en la reacción producida entre la enzima y el sustrato, puede medirse *in situ* por los termistores. En una determinación se colocan dos termistores, uno mide las variaciones de la temperatura del medio, y el otro las variaciones de temperatura por la reacción enzimática y las del medio. La diferencia entre las dos temperaturas es la variación de temperatura debida a la reacción enzimática.

d) Piezoeléctricos (de Masa)

Los sistemas de transducción piezoeléctricos, también denominados másicos, gravimétricos o acústicos, miden cambios directos de masa en la superficie del sensor inducidos por la interacción entre el analito y el sistema de reconocimiento. Los cristales piezoeléctricos de los que consta el diseño, se recubren con el elemento de reconocimiento que suele ser de bioafinidad, poniéndose en contacto con la muestra que contiene el analito que se desea detectar. La frecuencia de oscilación viene determinada por la masa del cristal, que varía cuando se produce la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito y da lugar a una variación en la frecuencia de oscilación. Existen dos clases dependiendo del tipo de onda acústica implicada; los basados

en onda acústica de volumen que son ondas de volumen que atraviesan el cristal y por tanto la resonancia ocurre en toda la masa del mismo, y los basados en onda acústica superficial, donde la resonancia ocurre sólo en la superficie del cristal, al tratarse de ondas transversales superficiales cuya energía se encuentra confinada en una zona de la superficie equivalente a una longitud de onda.

e) Nanomecánicos

En los transductores nanomecánicos el elemento de reconocimiento biológico se inmoviliza sobre la superficie de una micropalanca de silicio, que se sumerge en una muestra líquida. Generalmente se utilizan anticuerpos. La interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito produce un cambio diferencial en la tensión superficial del líquido y la micropalanca sufre una respuesta de tipo nanomecánico que consiste en un cambio de la deflexión o de la frecuencia de resonancia. La detección de la respuesta nanomecánica puede hacerse de un modo estático siendo la magnitud medida la deflexión de la micropalanca. Las moléculas receptoras solo se inmovilizan en un lado de la micropalanca y al introducir en la disolución las moléculas del analito, se produce un cambio de la tensión superficial entre ambos lados de la micropalanca, dando lugar a un curvamiento de la misma y a una deflexión del orden del nanómetro. La detección también puede hacerse de un modo dinámico, midiéndose la frecuencia de resonancia, que va a depender tanto del cambio de tensión superficial como del cambio de masa.

f) Magnéticos

Estos transductores normalmente se preparan a partir de magnetita (Fe_3O_4), greigita (Fe_3S_4), magemita (Fe_2O_3) y varios tipos de ferritas. Estas partículas, unidas a biomoléculas o elementos de reconocimiento, se utilizan con fines separativos o como marcadores combinados a sistemas de detección magnéticos.

Como se ha visto, existen múltiples elementos de reconocimiento y sistemas de transducción. La elección del transductor está condicionada por el tipo de elemento de reconocimiento elegido, ya que éste determina cuál será la variación en las propiedades físico-químicas que ocurra como consecuencia de la interacción. Además esta selección está condicionada al tamaño y la concentración del analito (Figura 1.4).

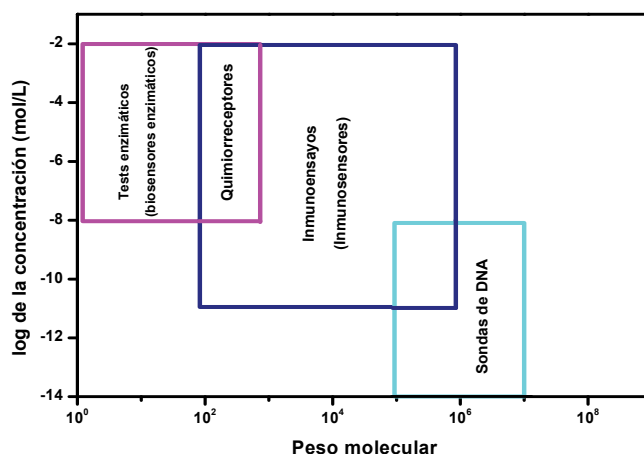


Figura 1.4.: Características específicas de los diferentes procedimientos analíticos

1.2.3. Biosensores enzimáticos

De los biosensores catalíticos, los más conocidos son los biosensores enzimáticos, tanto que a veces el término genérico de biosensores catalíticos se suele aplicar a estos dispositivos.

Los dispositivos electroquímicos son los transductores más utilizados en el desarrollo de biosensores enzimáticos, debido a que, poseen una serie de ventajas como son:

- a) Las medidas electroquímicas pueden ser realizadas en volúmenes pequeños (incluso del orden de nanolitros), lo que permite monitorización "in vivo".

- b) La señal obtenida, al ser eléctrica, permite la transducción directa de la velocidad de reacción en la señal de lectura.
- c) Los límites de detección se encuentran comprendidos entre 10^{-6} y 10^{-9} mol/L, pudiéndose detectar numerosos analitos de interés.
- d) La relativa simplicidad y el bajo coste de la instrumentación electroquímica facilita su aplicación.

Aunque a priori las técnicas electroanalíticas poseen baja selectividad, este inconveniente puede minimizarse al utilizar un sistema de reconocimiento biológico que posea una alta selectividad para determinados analitos.

La purificación de enzimas puede realizarse a través de métodos relativamente baratos, porque la mayoría de estas pueden ser aisladas de microorganismos, como p.e. hongos o bacterias, los cuáles producen estas enzimas en exceso de forma natural o después de manipulación genética. En las reacciones enzimáticas se produce la unión del sustrato a una región concreta de la enzima denominada centro activo, que está comprendido por un sitio de unión y un sitio catalítico. En ocasiones puede ser necesaria la presencia de cofactores o coenzimas (productos químicos no protéicos p.e. NAD^+ u oxígeno), que pueden participar en la reacción enzimática de dos formas distintas, a través de una fijación enérgica a la proteína, de manera que no son modificados una vez finalizado el ciclo catalítico, o bien como un segundo sustrato, modificándose después del ciclo, por lo que en general requieren de otra enzima para volver al estado original. Esta característica hace que, en principio, sea posible una monitorización continua y reversible, lo que no ocurre con otro tipo de material biológico, como p.e. con los anticuerpos.

La actividad enzimática se encuentra controlada normalmente por la presencia de estos cofactores y además por la temperatura, pH y fuerza iónica del medio en el que se desarrolla la catálisis.

Entre las diversas enzimas disponibles, las más utilizadas son las correspondientes a la familia de las oxidoreductasas, ya que se trata de enzimas muy estables

que catalizan reacciones de oxido-reducción y que pueden acoplarse a distintos sistemas de transducción.

La reacción catalítica enzimática es eficiente y extremadamente selectiva, por lo que se combinan los factores de reconocimiento específico y de amplificación necesarios para las aplicaciones analíticas de los biosensores.

Si la reacción enzimática involucra un solo sustrato, esta puede formularse como:



Para expresar la ecuación de la velocidad inicial en términos de magnitudes conocidas, se aplica el concepto de estado estacionario. Cuando la concentración de enzima es fija, la velocidad de la reacción catalizada enzimáticamente viene expresada por la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]} \quad [13]$$

donde $V_{m\acute{a}x}$ es la máxima velocidad de reacción y K_M es la constante de Michaelis-Menten, que corresponde a la concentración de sustrato para la cual la velocidad es igual a la mitad de la velocidad máxima. En la Figura 1.5 se muestra la dependencia típica de la velocidad de reacción enzimática con la concentración de sustrato, señalándose los valores de los parámetros K_M y $V_{m\acute{a}x}$, y las zonas donde la señal obtenida es útil para la determinación del sustrato y para la determinación de la actividad enzimática. El valor K_M de una enzima generalmente se encuentra comprendido en el rango 10^{-1} a 10^{-6} M; cuanto menor sea, implica que la enzima presenta una mayor afinidad por su sustrato y por lo tanto su unión es más fuerte. Desde el punto de vista analítico, cuanto mayor es la constante de Michaelis-Menten, la sensibilidad del método disminuye, pero aumenta el intervalo de linealidad.

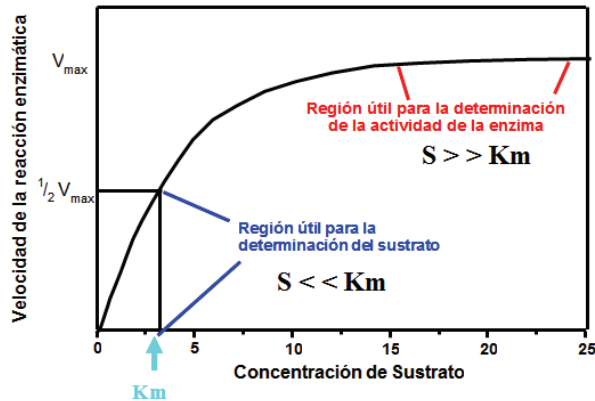


Figura 1.5.: Dependencia de la velocidad de la reacción enzimática en función de la concentración de sustrato

Se han desarrollado diferentes métodos para la transferencia de electrones entre el enzima y el transductor amperométrico, lo que permite diferenciar tres generaciones de biosensores amperométricos basados en oxidoreductasas. (Figura 1.6.)

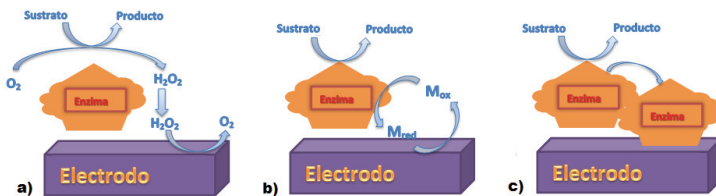
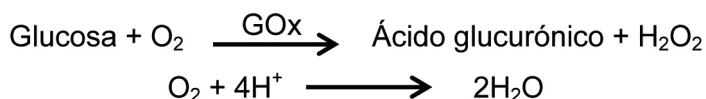


Figura 1.6.: Esquema de las tres generaciones de biosensores basados en oxidoreductasas: a) primera, b) segunda y c) tercera generación.

- **Primera generación.** Están basados en la medida de uno de los productos o del cofactor de la reacción enzimática. Por tanto, es necesario que la sustancia analizada tenga propiedades electroquímicas.

El electrodo de Clark pertenece a este grupo. Consiste en una membrana, compuesta por Glucosa oxidasa (GOx), inmovilizada sobre un electrodo que determina las variaciones de oxígeno en el medio. La concentración de

glucosa presente en el medio es cuantificada mediante la reducción del oxígeno en el cátodo de platino a - 700 mV, según el siguiente mecanismo:



Posteriormente se desarrolló un nuevo tipo de biosensor de primera generación basado en la medida electroquímica de la oxidación del agua oxigenada generada por la reacción enzimática,



En el caso de biosensores basados en deshidrogenasas (enzimas que facilitan el paso de protones de una especie a otra), es necesaria la presencia del cofactor nicotinamida adenín dinucleótido (NAD^+). El seguimiento de la reacción catalítica se realiza mediante la oxidación de NADH,



El inconveniente de estos cofactores es la necesidad de aplicar potenciales muy altos, que pueden oxidar o reducir a su vez otros analitos que haya en el medio (interferentes). Además, en este tipo de reacciones se dan procesos de polimerización de los productos de reacción, que suelen desactivar la superficie del electrodo. Todo esto condujo a la utilización de mediadores, lo que dio paso a la segunda generación de biosensores amperométricos.

- **Segunda generación.** La segunda generación de biosensores incorpora un mediador que se encarga de la transferencia electrónica entre el centro activo del enzima y la superficie del electrodo.

El mediador debe reaccionar de manera rápida con el centro activo, minimizando así la competición con el cofactor natural del enzima. Es necesario también que tenga buenas propiedades electroquímicas, por ejemplo un potencial redox

próximo a cero, con lo que se consiguen eliminar las reacciones redox de posibles interferentes. Los mediadores más utilizados, libres en disolución o inmovilizados junto con los enzimas, son entre otros el par ferri/ferrocianuro, derivados del ferroceno, 1,4-benzoquinona, azul de Meldola y azul de metileno.

- **Tercera generación.** La transferencia electrónica se realiza de forma directa entre el centro activo del enzima y la superficie del electrodo. Este tipo de biosensores muestra una mayor selectividad, puesto que trabajan a potenciales muy próximos a los intrínsecos del enzima, quedando menos expuestos a posibles interferentes. Una de las mayores dificultades en la construcción de este tipo de biosensores es como optimizar la transferencia electrónica entre el centro activo del enzima y la superficie del electrodo. La gran mayoría de enzimas tiene el centro activo en su interior y hace imposible un contado directo entre éste y la superficie del transductor.

El buen funcionamiento de un biosensor depende, en gran medida, de la inmovilización del sistema de reconocimiento biológico sobre el transductor. La estabilidad de las enzimas es un factor limitante en el tiempo de vida útil de un biosensor enzimático, por lo que se emplean diferentes métodos físicos o químicos para aumentarla. La inmovilización del material biológico es un proceso mediante el que se confina o localiza el bioreceptor sobre el transductor electroquímico, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad y que, en ocasiones, pueden reutilizarse. Por ello es necesario mantener inalterable en lo posible la estabilidad de dicho sistema de reconocimiento biológico. Uno de los procesos más importantes en la fabricación de un biosensor, ya que características tan importantes como la sensibilidad o el tiempo de vida, dependen en gran medida del tipo de inmovilización utilizado. La inmovilización enzimática, conlleva una serie de ventajas en Química Analítica: (a) en la mayoría de casos la estabilidad de la enzima se ve aumentada; (b) el material inmovilizado puede ser fácilmente separado de la muestra y reutilizado en posteriores análisis; y (c) la constante y estable actividad de

la biomolécula hace que la enzima sea parte integrante del dispositivo analítico.

Para incrementar, a lo largo del tiempo, la estabilidad estructural y funcional del material biológico empleado en el diseño de biosensores, se emplean distintos métodos de inmovilización, que proporcionan un medio en el que el biomaterial se encuentra protegido. Uno de los sistemas de inmovilización más utilizado consiste en la encapsulación del material biológico dentro de una matriz polimérica^{108,109}. A modo de ejemplo y puesto que la inmovilización de material biológico realizada en esta tesis se produjo con diversas enzimas oxidoreductasas, la glucosa oxidasa se ha inmovilizado, con éxito en una gran variedad de matrices como, en electropolímeros^{110,111}, hidrogeles^{95,96,112,113} así como en látex^{109,114}. En cuanto a la galactosa oxidasa se ha inmovilizado en electropolímeros¹¹⁵⁻¹¹⁷, en diferentes películas poliméricas^{99,104,118} e hidrogeles^{98,119}; la colina oxidasa en electropolímeros^{94,120-123} e hidrogeles^{98,99}; y la tirosinasa en electropolímeros¹²⁴⁻¹²⁶, hidrogeles¹²⁷, etc.

-
- ¹⁰⁸ S. Cosnier, *Biosens Bioelectron.*, **14(5)**, 443 (1999).
¹⁰⁹ S. Cosnier, S. Szunerits, R.S. Marks, A. Novoa, L. Puech, E. Perez, I. Rico-Lattes, *Talanta.*, **55**, 889 (2001).
¹¹⁰ E.A. DiMarzio, J. Res. Natl. Bur. Stand., Sect. A 68A., **611** (1964).
¹¹¹ F. Crespi, *J. Neurosci. Methods.*, **119(2)**, 173 (2002).
¹¹² M. Dixon, E.C. Webb, *Enzymes*. Academic Press, New York., (1979).
¹¹³ L. Doretto, D. Ferrara, S. Lora, F. Schiavon, F.M. Veronese, *Enzyme Microb Technol.*, **27(3-5)**, 279 (2000).
¹¹⁴ J.H. Glans, D.T. Turner, *Polymer.*, **22(11)**, 1540 (1981).
¹¹⁵ J.M. Gonzalez-Sáiz, C. Pizarro, *Eur. Polym. J.*, **37**, 435 (2001).
¹¹⁶ A. Guerrieri, F. Palmisano, *Anal Chem.*, **73(13)**, 2875 (2001).
¹¹⁷ H. Gülce, Y.S. Aktas, A. Gülce, A. Yildiz, *Enzyme and Microbial Technology.*, **32(7)**, 895 (2003).
¹¹⁸ E.I. Iwuoha, O. Adeloju, E. Dempsey, M.R. Smyth, J. Liu, J. Wang, *Biosens. Bioelectron.*, **10**, 661 (1995).
¹¹⁹ N.V. Kulagina, L. Shankar, A.C. Michael, *Anal Chem.*, **71(22)**, 5093 (1999).
¹²⁰ A. Rahman, D.S. Park, Y.B. Dhim, *Biosens. Bioelectron.*, **19(12)**, 1565 (2004).
¹²¹ S. Sen, A. Gülce, H. Gülce, *Biosens. Bioelectron.*, **19(10)**, 1261 (2004).
¹²² F. Ricci, A. Amine, G. Palleschi, D. Moscone, *Biosens. Bioelectron.*, **18(2-3)**, 165 (2003).

En la microencapsulación, el biocatalizador queda atrapado dentro de una red tridimensional inerte de un polímero siendo la actividad y la carga enzimática superior a la obtenida por unión covalente o simple adsorción. La estabilidad de la enzima en estas matrices suele ser el factor que determina el tiempo de vida del biosensor, pero además, este sistema de inmovilización presenta ventajas adicionales como su facilidad de manipulación y adaptación a distintos diseños, estabilidad, control del tamaño de poro, etc.

A pesar de estas ventajas, es difícil encontrar en la bibliografía biosensores con enzimas inmovilizadas en micropartículas poliméricas. En este sentido han surgido derivados vítreos conocidos como “sol-gel”^{128,129} que debido a su baja conductividad, se han utilizado sobre todo en el diseño de biosensores ópticos, y en menor medida en los amperométricos. Hasta el momento, se han utilizado micropartículas de metacrilato¹³⁰, alginato⁷², látex artificiales¹³¹ y acrilamida¹³².

En la Figura 1.7 se recoge en un esquema, los distintos tipos de inmovilización que se suelen emplear en la fabricación de biosensores. La inmovilización puede realizarse mediante **métodos físicos**, fundamentalmente por **adsorción** o por **atrapamiento**, y **métodos químicos**, mediante el **acoplamiento covalente** o por **entrecruzamiento** (crosslinking).

¹²³ S. Serradilla Razola, S. Pochet, K. Grosfils and J. M. Kauffmann, *Biosens. Bioelectron.*, **18(2-3)**, 185 (2003).

¹²⁴ S. Kiralp, S., Toppare, L. *Int. J. Biol. Macromol.*, **33**, 37 (2003).

¹²⁵ C. Védrine, S. Fabiano, S. Tran-Minh, *Talanta.*, **59**, 535 (2003).

¹²⁶ S.S. Rajesh, W. Takashima, K. Kaneto, *React. Funct. Polym.*, **59**, 163 (2004).

¹²⁷ N. Munjal, S.K. Sawhney, *Enzym. Micro. Tech.*, **30**, 613 (2002).

¹²⁸ I. Gill, A. Ballesteros, *Trends Biotechnol.*, **18(11)**, 282 (2000).

¹²⁹ S. Andreescu, L. Barthelmebs, J.L. Marty, *Anal Chim Acta.*, **464(2)**, 171 (2002).

¹³⁰ V. Bulmus, H. Ayhan, E. Piskin, *Modified Chem. Eng. J.*, **65**, 71 (1997).

¹³¹ S. Cosnier, S. Szunerits, R.S. Marks, A. Novoa, L. Puech, E. Perez, I. Rico-Lattes, *Electrochem. Commun.*, **2**, 851 (2000).

¹³² B.J. Rubio Retama, E.J. López-Cabarcos, B. López-Ruiz, *Talanta.* **68 (1)**, 99 (2005).

El método de inmovilización más sencillo es la **adsorción** de las biomoléculas sobre materiales adsorbentes que sean insolubles en el medio de ensayo. Este tipo de inmovilización se basa en la unión de la biomolécula a la matriz mediante interacciones de tipo no covalente: fuerzas electrostáticas, hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno o de Van der Waals. El procedimiento de adsorción consiste en poner en contacto las moléculas de enzima con el material adsorbente durante el tiempo suficiente para que se produzcan las interacciones. Los adsorbentes utilizados son: resinas de intercambio iónico, gel de sílice, arcillas, alúmina, colágeno, vidrio poroso y materiales cerámicos. Las principales ventajas de este método son su sencillez y bajo coste, aunque tiene como contrapartida que es un proceso reversible (debido a las uniones débiles), por lo que cambios de pH, fuerza iónica o de temperatura en el medio pueden provocar la desorción de la biomolécula. Este tipo de inmovilización es especialmente interesante cuando la enzima es insoluble en el medio de trabajo. En este caso ésta puede adsorberse directamente sobre el transductor, sin necesidad de emplear ningún material adsorbente.

El **atrapamiento** puede llevarse a cabo de tres formas diferentes: (a) por inclusión dentro de una matriz de polímero altamente entrecruzado o en un gel (microencapsulación); (b) por inclusión en la matriz del transductor; (c) o por separación de la biomolécula del seno de la disolución mediante encapsulamiento en una membrana semipermeable (en fibras huecas o en reactores de membrana). Las matrices más utilizadas son: geles de agar, nylon, almidón y poliacrilamida, así como matrices electrónicas compositas rígidas formadas por grafito-teflón o grafito-resina epoxi. Estos métodos presentan como ventajas la sencillez, el bajo coste, la necesidad de poca cantidad de enzima y su proximidad al transductor y como desventaja la no regeneración.

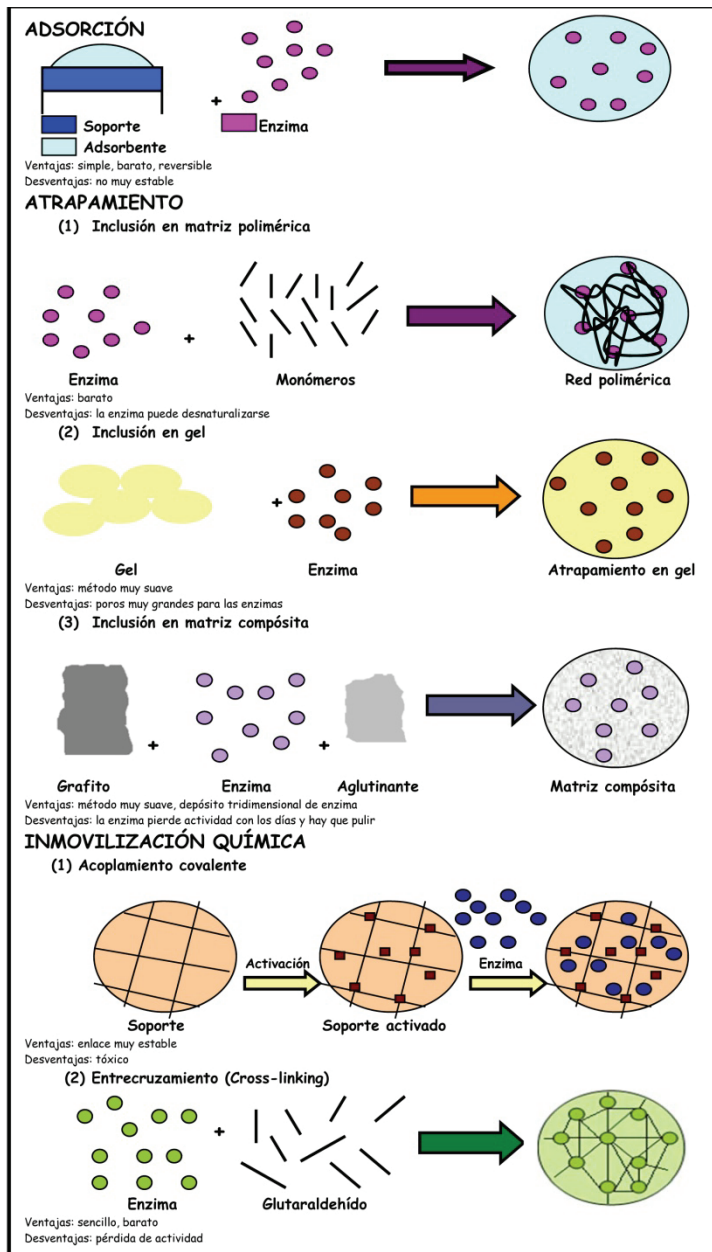


Figura 1.7.: Tipos de inmovilización de una enzima para su aplicación en biosensores

Los métodos químicos de inmovilización pueden llevarse a cabo por **uniones covalentes** entre la enzima y los grupos activados de los monómeros o polímeros, o por el **entrecruzamiento** intermolecular a dichos grupos activados, presentando de este modo una fuerte fijación al polímero. Los métodos basados en el entrecruzamiento intramolecular se llevan a cabo entre enzimas y polímeros con grupos bi y multifuncionales, por copolimerización con otra proteína inerte o por adsorción de las biomoléculas en un adsorbente, realizándose después el entrecruzamiento. Las propiedades de la enzima pueden verse alteradas con la inmovilización, pudiendo el mismo método afectar de forma diferente a distintas enzimas.

Existen además distintas tecnologías utilizadas en la inmovilización enzimática, tales como la sol-gel, las películas polimerizadas por plasma, las monocapas autoensambladas, las membranas de bicapas lipídicas y las partículas magnéticas bacterianas, que se presentan también como alternativas en el campo del diseño de los biosensores.

En este trabajo se ha utilizado la microencapsulación como sistema de inmovilización enzimática a partir del atrapamiento del material biológico en micropartículas poliméricas entrecruzadas con bisacrilamida a partir del método por emulsión concentrada.

1.2.4. *Aplicaciones y perspectivas futuras de los Biosensores*

Desde del primer concepto de biosensor en 1962, el campo de la investigación sobre biosensores ha ido creciendo de forma imparable hasta convertirse en área fundamental de trabajo. La introducción en el mercado de los biosensores de glucosa durante los años 90, que son utilizados diariamente por miles de personas en todo el mundo, supuso la prueba más concluyente de la utilidad de la tecnología de los biosensores, mejorando la calidad de vida de los enfermos diabéticos. Estos biosensores continúan siendo los más investigados, ocupando el 87% del mercado total actual de los biosensores¹³³, aunque biosensores

¹³³ J. D. Newman, L. J. Tigwell, A. P. F. Turner, P. J. Warner, *Biosen. Bioelectron.*, **20(12)**, 2512 (2005).

destinados a la detección de lactato, oxígeno, oxígeno reactivo (ROS), y las especies del nitrógeno (RNS) entre otros, también están siendo objeto de investigación¹³⁴⁻¹³⁹.

Los criterios de funcionamiento para los biosensores in vivo no dependen solamente del analito específico, sino también del uso previsto para el biosensor. Debido a la importancia creciente de la neurobiología, sustratos como el lactato y el piruvato han sido evaluados en cerebros de mamíferos, en células simples, en cultivos celulares y en tejidos, así como también se ha estudiado el transporte de iones Ca^{2+} , Na^{+} y K^{+} en estos medios¹⁴⁰⁻¹⁴³. Otros importantes analitos implicados en la neurotransmisión han sido también estudiados, incluyendo acetilcolina y colina^{144,145}, ascorbato (sobre todo como interferente)¹¹⁹, NAD(H)¹⁴⁶ y dopamina¹⁴⁷, así como las uniones del lactato y el piruvato con ROS y óxido nítrico (NO), han sido también monitorizadas^{148,149}.

¹³⁴ V. Brovkovich, E. Stolarczyk, J. Oman, P. Tomboularian, T.J. Malinski, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **19**, 135 (1999).

¹³⁵ F. Lisdat, F.W. Scheller, *Anal. Lett.* **33**, 1 (2000).

¹³⁶ G.S. Wilson, R. Gifford. *Biosens Bioelectron* **20(12)**, 2388 (2005).

¹³⁷ J.W. Mo, W. Smart. *Front Biosci.*, **(9)**, 3384 (2004).

¹³⁸ K. Tohda, M. Gratzl. *Chemphyschem.*, **4(2)**, 155 (2003).

¹³⁹ W.K. Ward, J.L. House, J. Birck, E.M. Anderson, L.B. Jansen. *Diabetes Technol Ther.*, **6(3)**, 389 (2004).

¹⁴⁰ R.P. Buck, V.V. Cosofret, E. Lindner, S. Ufer, M.B. Madaras, T.A. Johnson, R.B. Ash, M.R. Neuman, *Electroanalysis*, **7**, 846 (1995).

¹⁴¹ P.J. Smith, K. Hammar, D.M. Porterfield, R.H. Sanger, J.R. Trimarchi, *Microsc. Res. Tech.*, **46**, 398 (1999).

¹⁴² R.T. Kennedy, L.M. Kauri, G.M. Dahlgren, S.K. Jung, *Diabetes*, **51**, S152 (2002).

¹⁴³ S. Kahlert, G. Reiser, *Cell Calcium*, **36**, 295 (2004).

¹⁴⁴ J. Cui, N.V. Kulagina, A.C. Michael, *J. Neurosci. Methods*, **104**, 183 (2001).

¹⁴⁵ K.M. Mitchell, *Anal. Chem.*, **76**, 1098 (2004).

¹⁴⁶ Z. Liu, O. Niwa, T. Horiuchi, R. Kurita, K. Torimitsu, *Biosens. Bioelectron.*, **14**, 631 (1999).¹²¹

¹⁴⁷ M.V. Avshalumov, B.T. Chen, S.P. Marshall, D.M. Pena, M.E. Rice, *J. Neurosci.*, **23**, 2744 (2003).

¹⁴⁸ P. Manning, C.J. McNeil, J.M. Cooper, E.W. Hillhouse, *Free Radic. Biol. Med.*, **24**, 1304 (1998).

¹⁴⁹ W. Scheller, W. Jin, E. Ehrentreich-Forster, B. Ge, F. Lisdat, R. Buttemeier, U. Wollenberger, F.W. Scheller, *Electroanalysis*, **11**, 703 (1999).

Los estudios fundamentales en el desarrollo de un biosensor se pueden dividir en tres campos: elementos de reconocimiento molecular; metodología en la construcción del biosensor; y dispositivos básicos del biosensor. En el desarrollo de elementos de reconocimiento se han utilizado; enzimas, microorganismos, anticuerpos, receptores, células animales o vegetales, organelas y tejidos. También se ha investigado elementos de reconocimiento molecular de nuevos biomateriales y de materiales artificiales tales como ácidos nucleicos peptídicos y polímeros de impresión molecular (PIMs). Como técnicas y herramientas actuales para la construcción de biosensores, las técnicas de microfabricación, incluyendo la fabricación a nanoescala, son las más significativas en la miniaturización de chips o dispositivos biodetección, ya que permiten la reducción del coste de producción en masa, la reducción del volumen de la muestra, etc. Además se han estudiado y utilizado varias técnicas y herramientas para mejorar las características del biosensor, tales como los inmunoreactores, los polímeros conductores, las películas de plasma polimerizado (PPFs), partículas bacterianas magnéticas (BMPs), etc. La investigación emergente para crear nuevos dispositivos de biodetección se centra, entre otros, en el desarrollo de sensores tales como sensores de microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), sensores ópticos basados en sensores de resonancia de plasmones superficiales (SPR), los chips de microfluidos asociados a electroforesis capilar, y los chips arrays para ácidos nucleicos y proteínas.

La aplicación clínica de los biosensores para medir otros analitos tales como dianas de DNA y hormonas específicas tienen un extenso campo de aplicación en cáncer, habiéndose desarrollando por ejemplo un sensor para el diagnóstico de cáncer de próstata basado en la detección de antígeno específico de próstata mediante biosensores amperométricos. También se han utilizado biosensores electroquímicos aplicados al diagnóstico de cáncer en la detección de mutación de p53 a través de ácido nucleicos peptídicos, o aplicados al diagnóstico de la fibrosis quística mediante la cuantificación de la expresión génica a través del ARNm. Este tipo de electrodos se prestan bien a la miniaturización.

Las enfermedades infecciosas tales como Hepatitis B y C o Papilomavirus humano, vienen siendo objeto de nuevos desarrollos en biosensores en la búsqueda de sistemas más rápidos y eficaces de diagnóstico.

Las nuevas generaciones de sensores deberán responder a problemas analíticos existentes en la actualidad, como el control del medio ambiente, la mejora de la calidad de vida, la gestión de residuos, la valoración de riesgos, la monitorización de los sistemas de control de los procesos industriales y la necesidad de detectar bajos niveles de concentración para un gran número de analitos en agua, aire, alimentos y matrices biológicas.

A pesar de los esfuerzos por encontrar materiales receptores cada vez más selectivos (ligandos macrocíclicos, polímeros, cerámicas, etc.), actualmente muchos investigadores se centran en imitar el comportamiento biológico de reconocimiento molecular, siendo más selectivos y nos acercan más al concepto de biosensor ideal. Este es el caso de la aparición de recientes sensores genéticos basados en materiales que combinan un agente de reconocimiento biológico (cadena de ADN), responsables de la selectividad, con transductores que proporcionan sensibilidades adecuadas, señales medibles.

2

OBJETIVOS

El propósito del presente trabajo se sitúa dentro de una de las líneas de investigación de nuestro grupo, desarrollo de nuevos sistemas de inmovilización de enzimas para el diseño y optimización de nuevos biosensores electroquímicos de aplicación analítica en ciencias farmacéuticas. Nuestro objetivo principal es la utilización de diversos microgeles poliméricos como sistemas de inmovilización enzimáticos y posterior diseño y optimización de distintos biosensores amperométricos en la determinación cuantitativa de diversos sustratos de interés clínico, farmacéutico, ambiental, como son la glucosa, galactosa, compuestos fenólicos, colina y acetilcolina.

Para la determinación de glucosa, galactosa, colina y acetilcolina, el principio de detección se basa en la medida de la corriente generada por la oxidación del peróxido, producto de la reacción enzimática, utilizando como electrodo de trabajo un electrodo de platino modificado con microgeles. El principio de detección en el caso de los compuestos fenólicos se basa en la medida de la corriente que se genera cuando tiene lugar la reducción de la o-quinona producida enzimáticamente, utilizando un electrodo de trabajo de carbón vitrificado.

Los objetivos concretos han sido:

1. Utilizar distintas matrices poliméricas como sistema de inmovilización enzimática. Como estrategia de inmovilización de las enzimas se ha utilizado el atrapamiento en micropartículas poliméricas entrecruzadas. Se han preparado 4 tipos de micropartículas para la inmovilización del biomaterial, basadas en los siguientes polímeros; poliacrilamida, poli etilenglicol metil éter metacrilato, poli dimetil amino etil metacrilato y poli ácido metacrílico.
2. Optimizar el sistema de inmovilización y realizar la posterior caracterización fisicoquímica las micropartículas con el fin de lograr la máxima eficacia en la inmovilización enzimática. Dentro de la caracterización se estudiará la morfología de las micropartículas sintetizadas, así como las propiedades fisicoquímicas tales como el tamaño, temperatura de transición vítrea, y

estructura interna, mientras que en la optimización se estudiarán diversos parámetros relacionados con la matriz como la temperatura de polimerización y el porcentaje de polimerización, además de estudiar el efecto de la inmovilización de la enzima en la matriz sobre la actividad de la enzima inmovilizada.

3. Preparar biosensores enzimáticos: Se pretende diseñar biosensores amperométricos para su utilización en la determinación de distintos sustratos de interés clínico. Se optimizarán los parámetros analíticos de estos dispositivos, tales como sensibilidad, intensidad máxima, límite de detección, precisión y tiempo de respuesta. Se estudiará el efecto de distintos factores que afectan a la respuesta del biosensor, tales como el pH, la temperatura, el potencial, la carga enzimática, para de esta forma optimizar los distintos dispositivos analíticos y obtener las mejores propiedades analíticas.
4. Realizar un estudio comparativo de los distintos biosensores de glucosa oxidasa, comparando los resultados obtenidos en cuanto a condiciones experimentales óptimas, tiempo de respuesta, estabilidad, sensibilidad y límite de detección.
5. Aplicar los biosensores de glucosa oxidasa desarrollados, en el análisis de glucosa en sueros sanguíneos estudiando su aplicabilidad.

En la primera parte del trabajo, se utilizarán biosensores basados en micropartículas de poliacrilamida, para desarrollar biosensores monoenzimáticos con galactosa oxidasa (GLOx), tirosinasa (PPO), colina oxidasa (ChOx), así como biosensores bienzimáticos con acetilcolinesterasa (AChE) y colina oxidasa (ChOx). El comportamiento de la glucosa oxidasa (GOx) en el citado polímero había sido profundamente estudiado¹¹⁰, por lo que sólo se ha utilizado en la segunda parte de este trabajo, dónde se ha servido como enzima modelo para la optimización del sistema de inmovilización en nuevos polímeros.

3

REACTIVOS, INSTRUMENTACIÓN Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

3.1. Reactivos y Disoluciones

3.1.1. Reactivos

Todas las disoluciones se preparan diariamente con agua purificada mediante un sistema Milli-Q (Milli-Q RG, Millipore).

Para desoxigenar las disoluciones se hizo pasar corriente de nitrógeno (N_2 comprimido air liquide, Alphagaz N2-1) de pureza 99,999%.

En la Tabla 3.1 se muestran los reactivos utilizados en este trabajo.

Reactivo	Casa comercial	Nº Catálogo
Glucosa oxidasa	Sigma-Aldrich	G6766
Tirosinasa	Sigma-Aldrich	T3824
Galactosa oxidasa	Sigma-Aldrich	G7907
Colina oxidasa	Sigma-Aldrich	C5896
Acetilcolinesterasa	Sigma-Aldrich	C2888
NNN'N'-tetra-metil-etilen-diamina	Fluka	87687
Acrilamida	Sigma-Aldrich	A8887
NN'-metilen-bis-acrilamida	Sigma-Aldrich	14607-2
Poly ethylen glycol metil ether methacrylate	Sigma-Aldrich	447935
Dimethyl amino etil methacrylate	Sigma-Aldrich	234907
Methacrylic acid	Sigma-Aldrich	395374
Span 80	Fluka	85548
Dodecano	Sigma-Aldrich	D22, 110-4
Persulfato de amonio	Fluka	09913
D(+) glucosa	Sigma-Aldrich	G5250
Catecol	Sigma-Aldrich	C9510
Fenol	Sigma-Aldrich	P3653

3-clorofenol	Sigma-Aldrich	C62808
4-clorofenol	Sigma-Aldrich	C62816
m-cresol	Sigma-Aldrich	C85727
p-cresol	Sigma-Aldrich	C85751
Dopamina	Sigma-Aldrich	56610
Galactosa	Sigma-Aldrich	G0750
Nicotina	Sigma-Aldrich	36733
Acetilcolina	Sigma-Aldrich	A6625
Ácido ascórbico	Sigma-Aldrich	A 5960
Ácido úrico	Sigma-Aldrich	U 0881
Nafion	Sigma-Aldrich	51021-1
Disolución de glutaraldehído, 25% en agua	Sigma-Aldrich	G6257
Di-Sodio Hidrógeno Fosfato anhidro	Panreac	131679
Mono-Sodio Dihidrógeno Fosfato anhidro	Panreac	122018
Acetato sódico	Merck	6268
Hidróxido sódico	Panreac	141687
Ácido clorhídrico	Panreac	141019
Acetona	Panreac	141007
Colina Cloruro	Sigma-Aldrich	C7017

Tabla 3.1.: Reactivos generales y específicos utilizados

3.1.2. Preparación de disoluciones:

- Disolución tampón $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,1 M, pH 6,0: Se prepara disolviendo las cantidades adecuadas de las sales disódica y monosódica. Esta disolución se prepara semanalmente.
- Disoluciones tampón 0,05 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/$ 0,05 M CH_3COONa para hacer batería de pH de 4,0 a 8,0 ajustando con HCl. Se prepara disolviendo las cantidades adecuadas de las sales monosódicas. Esta disolución se prepara semanalmente.
- Disolución patrón de galactosa: Se obtiene disolviendo la cantidad necesaria de galactosa anhidra en una disolución tampón fosfato sódico 0,1M. Esta disolución se prepara diariamente.

- Disolución patrón de colina: Se obtiene disolviendo la cantidad necesaria de colina anhidra en una disolución tampón fosfato sódico 0,1M. Esta disolución se prepara diariamente.
- Disolución patrón de colina/acetilcolina: Se obtiene disolviendo la cantidad necesaria de colina anhidra y acetil colina anhidra en una disolución tampón fosfato sódico 0,1M. Esta disolución se prepara diariamente.
- Disoluciones patrón de los compuestos fenólicos: Se obtienen disolviendo la cantidad necesaria del fenol correspondiente (fenol, catecol, m-cresol, p-cresol, 3-clorofenol, 4-clorofenol, dopamina) en la disolución tampón fosfato sódico 0,1M. Estas disoluciones se preparan diariamente.
- Disolución patrón de glucosa: Se obtiene disolviendo la cantidad necesaria de glucosa anhidra en una disolución tampón fosfato sódico 0,1M. Esta disolución se prepara diariamente.

3.2. Instrumentación

Las diversas y variadas las técnicas empleadas en la caracterización del sistema de inmovilización enzimática formado por microgeles, así como para la obtención de las medidas electroquímicas realizadas por técnicas electroquímicas, se describen a continuación:

3.2.1. Calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido, DSC ("Differential Scanning Calorimetry"), es un método térmico basado en la medida de la cantidad de calor que es necesario aplicar a una muestra problema, para que conserve la misma temperatura que la muestra de referencia. Para la realización de las medidas se ha utilizado un calorímetro diferencial de barrido Mettler modelo 820 conectado a un sistema de enfriamiento de nitrógeno líquido, que permite un intervalo de temperatura de trabajo

comprendido entre -150°C y $700^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Las entalpías de sustancias puras, se obtienen con un error de $\pm 1\%$. El horno está conectado a una purga de gas a $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Para su análisis, las muestras se introducen en cápsulas de aluminio, el peso aproximado de cada muestra es de $5,0 \text{ mg}$ y la velocidad de calentamiento $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

3.2.2. Difracción de rayos X

La difracción de luz de rayos X es una potente técnica empleada para el estudio de la estructura interna de los microgeles. Las medidas de difracción de las micropartículas poliméricas se realizan en un difractómetro Philips X'Pert modelo PW3050. Los difractogramas se registran cubriendo un intervalo angular comprendido entre $1,5^{\circ} < 2\theta < 35^{\circ}$, registrando cada segundo $0,01^{\circ}$, a una temperatura de 25°C , con una precisión en la medida de la temperatura de $\pm 3^{\circ}$. El método utilizado para la adquisición de los difractogramas se realiza por reflexión del haz incidente sobre la muestra, produciéndose un error estimado en la posición de las reflexiones de $\pm 0,02^{\circ}$.

3.2.3. Microscopia electrónica de barrido

La microscopia electrónica de barrido (SEM), es una técnica que permite una confirmación visual del tamaño, forma y distribución de tamaños de las micropartículas poliméricas, aportando además una imagen tridimensional de las mismas. La principal desventaja de esta técnica reside en el hecho de que las muestras son analizadas en estado seco y, por consiguiente, no resulta posible la medida de los tamaños de las partículas en el estado hinchado. Para realizar el análisis, se deposita una pequeña cantidad de micropartículas, previamente liofilizadas, sobre un porta y se cubren de una película de oro. Las medidas se realizan con un microscopio marca JOEL, modelo JSM-6400, operando a 20 kV . El recubrimiento con oro se realiza con un Sputter Coater marca Blazer (SCD-004) en una atmósfera de argón de $0,05 \text{ torr}$ y una corriente de 20 mA .

3.2.4. Espectrofotometría de absorción UV-VIS

Con objeto de estudiar la eficacia catalítica del sistema de inmovilización enzimática, se realizó un estudio comparativo de las absorbancias medidas de las disoluciones generadas una vez producida la reacción enzimática con un espectrofotómetro UV-visible CARY 300 Bio. Se realizaron ensayos diferentes según la enzima implicada. La medida de la eficacia de la inmovilización de la GOx en las micropartículas sintetizadas se basa en la reacción del peróxido de hidrógeno producto de la reacción enzimática con una disolución de yoduro. En una primera etapa la glucosa se oxida por medio de la enzima glucosa oxidasa para formar ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 formado reacciona con el yoduro (I^-) para formar yodo (I_2). El I^- , que se encuentra en exceso en la disolución, forma junto con el I_2 el ión triyoduro (I_3^-) cuya señal a 353 nm es proporcional a la concentración de H_2O_2 y ésta a la de glucosa¹⁵⁰. Para medir la actividad de la ChOx se compararon las absorbancias obtenidas de las hidrólisis del sustrato acetiltiocolina (ATCh) por la enzima colinesterasa producidas en 2 tipos de muestras: disolución de enzima y disolución de micropartículas con enzima inmovilizada a las que se les añade colina. La técnica espectrofotométrica más utilizada es el método de Ellman¹⁵¹. La tiocolina liberada reacciona con un cromóforo, el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), dando lugar a un compuesto de color amarillo cuyo máximo de absorbancia presenta una longitud de onda de 412 nm. La cantidad de indicador generada, y por tanto la absorbancia medida a 412 nm, será proporcional a la cantidad de colina. Para medir la actividad de la PPO se compararon las absorbancias obtenidas de las o-quinonas producidas enzimáticamente en 2 tipos de muestras: disolución de enzima y disolución de micropartículas con enzima inmovilizada a las que se les añade catecol. Se prepararon 2 muestras: (i) una dispersión formada por 3 mg de micropartículas de $\eta = 4,0\%$, (lo que equivale según

¹⁵⁰ M.P. Cañizares, A.N.A. Cañas, *Tecnología*, Oct./Nov. 18 (2006)

¹⁵¹ G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres, R.M. Featherstone., *Biochem. Pharmacol.* 7 88-95 (1961).

los datos del fabricante a 29,89 UI de enzima) en 5 mL de disolución tampón fosfato sódico 0,1M, pH 6,0 y (ii) una disolución de 29,89 UI de enzima en 5 mL de la misma disolución tampón. En ambos casos se añadieron 0,5 mM de catecol y se determinó la actividad enzimática de ambas muestras mediante las medidas espectrofotométricas a 380 nm de las o-quinonas generadas enzimáticamente tras la adicción de catecol según el método propuesto por Cumming y col.¹⁵². Se encontró que la actividad enzimática de la dispersión de micropartículas fue un 74% de la actividad enzimática de la disolución de enzima.

3.2.5. *Analizador de partículas Galai-Cis*

El analizador de partículas Galai-Cis se utiliza para la medida del tamaño de las micropartículas poliméricas. Este analizador permite medir partículas con tamaños comprendidos entre 2 y 300 μm .

3.2.6. *Dispersión de luz láser*

Para realizar un estudio más detallado del tamaño de partículas se utilizó el sistema de dispersión de luz laser, que permitía la medida de tamaños por debajo de 2 μm . El analizador utilizado fue Malvern Mastersizer X (Malvern instruments Ltd, Worcestershire, Reino Unido). La técnica se basa en la predicción del comportamiento de las partículas sobre la dispersión de la luz, las cuales dispersan luz en todas las direcciones con un patrón de intensidad que es dependiente de su tamaño. La luz dispersada tendrá diferentes intensidades según el ángulo de observación.

Las medidas se realizaron con una onda de haz láser fija a 690 nm y se utilizaron lentes de 45 mm, 100 mm y 300 mm necesarias para medir partículas de diámetro entre 0,1-300 μm . La preparación de muestras se realizó dispersándolas en tampón fosfato sódico 0,1 M en un baño

¹⁵² E.A. Cummings, S. Linquette-Mailley, P. Mailley, S. Cosnier, B.R. Egging, E.T. McAdams, *Talanta*. **55**, 1015 (2001).

ultrasónico durante 3 minutos. El tamaño medio de la muestra se obtuvo mediante la media de 5 medidas.

3.2.7. Amperometría

Esta técnica se basa en la medida de la corriente electrolítica a fin de relacionarla con la concentración de las especies electroactivas, que participan en una reacción electroquímica y que debido a su difusión hacia el electrodo de trabajo, dan lugar a una corriente electrolítica¹⁵³.

Las medidas amperométricas se realizaron con un potenciostato, Metrohm E-506, conectado a una celda electroquímica termostatzada con 3 electrodos: electrodo de referencia de calomelanos saturado (ECS) o de Ag/AgCl/KCl (sat), un electrodo auxiliar de barra de platino y un electrodo de trabajo, en nuestro caso el biosensor, constituido por un electrodo de platino en contacto con la enzima inmovilizada en el caso de que la enzima inmovilizada sea GOx, GlOx, ChOx/AChE, o, carbón vitrificado en contacto con la enzima en el caso de que esta sea PPO (Figura 3.1), ambos electrodos de trabajo con una superficie electródica de 3 mm.

¹⁵³ J.M. Pingarrón Carrazón, P. Sánchez Batanero, *Química Electroanalítica. Fundamentos y Aplicaciones*. Madrid (1999).

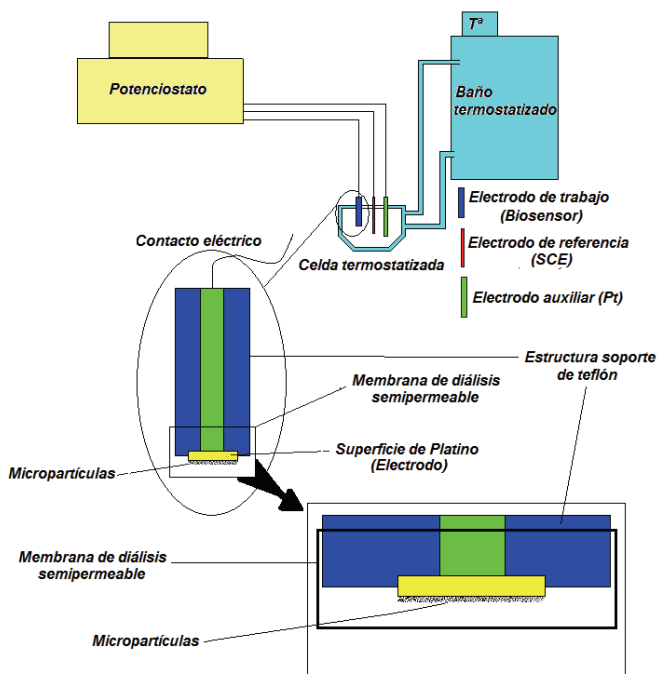


Figura 3.1.: Diseño del sistema electroquímico de trabajo

Todas las experiencias realizadas, se llevaron a cabo en celdas termostatzadas con la ayuda de un termostato de circulación Julabo (-50-200°C).

3.2.8. Voltamperometria cíclica

Las voltamperometrías cíclicas se realizan con un potenciostato Autolab 100 conectado a un ordenador equipado con el programa Autolab.

3.2.9. Potenciometría

Las medidas de pH tanto de los tampones como de las emulsiones obtenidas, se realizan en un pH-metro Mettler Toledo MP-230.

3.2.10. Electrodos, células de trabajo y membrana de diálisis

Electrodos de trabajo

- Electrodo de carbono vitrificado (superficie 3 mm) con tirosinasa inmovilizada en micropartículas preparados según se describe en lo apartado 3.3.2
- Electrodo de platino (superficie 3 mm) con glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, colina oxidasa o acetilcolinesterasa inmovilizadas en micropartículas, preparados según se describe en el apartado 3.3.2.

Electrodos de referencia

- Electrodo de calomelanos saturado (ECS)
- Electrodo de Ag/AgCl/KCl (sat)

Electrodo auxiliar

- Electrodo de barra de platino

Células electroquímicas

- De 10 mL de capacidad y termostatizadas

Membrana de diálisis

- Para retener las micropartículas sobre la superficie del electrodo de trabajo, se ha empleado una membrana de diálisis con un corte de peso molecular comprendido entre 12000 y 14000 D de Spectrum Medical Industries.

3.3. Procedimientos Experimentales

3.3.1. Inmovilización de enzimas redox en microgeles

Habiendo utilizado anteriormente en nuestro grupo la enzima GOx (E.C. 1.1.3.4) de *Aspergillus niger* (425 UI/mg. Pm=160,000 Da) como enzima tipo, debido a su buena robustez, su bajo coste y su comportamiento bien conocido, en este trabajo se investigó la inmovilización de otras enzimas oxidoreductasas, tales como GlOx (E.C.1.1.3.9) de *Dactylium dendroxides* (14 UI/mg, Pm =72,000 Da), PPO

(E.C. 1.14.18.1) de *Mushrooms* (7500 UI/mg, Pm=128,000 Da) ChOx (E.C. 1.1.3.17) de *Alcaligenes sp.* (100 UI/mg, Pm=78,000 Da) y AChE (E.C. 3.1.1.7) de *Electric eel, type VI-S* (349 UI/mg, Pm=45,000 Da).

La inmovilización de enzimas en el interior de micropartículas se realiza por polimerización desde emulsión concentrada de fase interna acuosa (W/O)¹⁵⁴. Las emulsiones concentradas son aquellas en las que la fracción de volumen (Φ) es mayor de 0,74.

$$\Phi = \frac{V_{F.interna}}{V_{F.interna} + V_{F.externa}} \quad [14]$$

donde $V_{F.interna}$ es el volumen de fase interna acuosa y $V_{F.externa}$ es el volumen de fase externa oleosa.

La preparación de micropartículas por polimerización desde emulsión concentrada de monómeros situados en la fase dispersa presenta una serie de ventajas respecto al método clásico de polimerización en emulsión: la velocidad de polimerización y el peso del polímero resultante son mayores, el rendimiento de la síntesis se mejora y se puede controlar el tamaño de las micropartículas según el tamaño de los glóbulos de la emulsión concentrada de partida. Además, al utilizar pequeñas cantidades de fase oleosa se convierte en un método económico y poco contaminante.

La síntesis de micropartículas por polimerización desde emulsión concentrada (Figura 3.2), se realiza siguiendo los siguientes pasos:

- i) *Preparación de la emulsión concentrada acuosa/oleosa.*

Se preparan por separado las 2 fases que formarán la emulsión. La fase externa u oleosa la constituye el tensioactivo solubilizado en dodecano. Para preparar emulsiones W/O, se utiliza un tensioactivo con un coeficiente hidrofilia-lipofilia

¹⁵⁴ A. Terreros, P. Galera, E. López-Cabarcos. *Progr. Colloid Polym. Sci.*, **115**, 50 (2000).

bajo, como el Span 80 (HLB 4,2). La fase interna o acuosa consiste en una disolución de monómero, agente entrecruzante N-N'-metilen-bis-acrilamida (BA), iniciador persulfato de amonio (PSA) y la enzima que se quiere inmovilizar, en tampón fosfato sódico 0,1 M de pH entre 6,0 y 7,4 (según la enzima utilizada, y para evitar la desnaturalización de la misma).

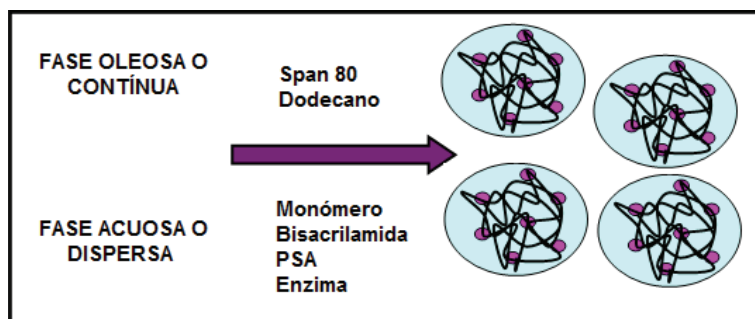


Figura 3.2.: Síntesis de micropartículas por polimerización en emulsión

Antes de que se forme la emulsión, se pasa una corriente de nitrógeno a través de las fases acuosa y oleosa con el fin de eliminar el O_2 disuelto. A continuación, en atmósfera inerte y con agitación magnética, se inyecta la fase acuosa gota a gota sobre la oleosa, consiguiendo una emulsión de aspecto lechoso (Figura 3.3).

ii) Polimerización de la emulsión

Se añade N,N,N,N'-tetrametil-etilen-diamina, que actúa como acelerador de la polimerización. Se mantiene el sistema en agitación durante 60-90 minutos hasta completarse la polimerización, a una temperatura inferior a la de desnaturalización de la enzima.

iii) Recuperación y conservación de las micropartículas

Se añaden 10 mL de acetona al producto obtenido, la emulsión se rompe y las micropartículas obtenidas precipitan. El precipitado obtenido se centrifuga a 4500 rpm durante 15 minutos con la disolución tampón de fosfato, guardando el líquido sobrenadante para comprobar si

contiene enzima. Las micropartículas se liofilizan durante 24 horas para eliminar el agua de las micropartículas empleándose un liofilizador Leybold-Heraeus y se conservan en cámara frigorífica a -4°C .

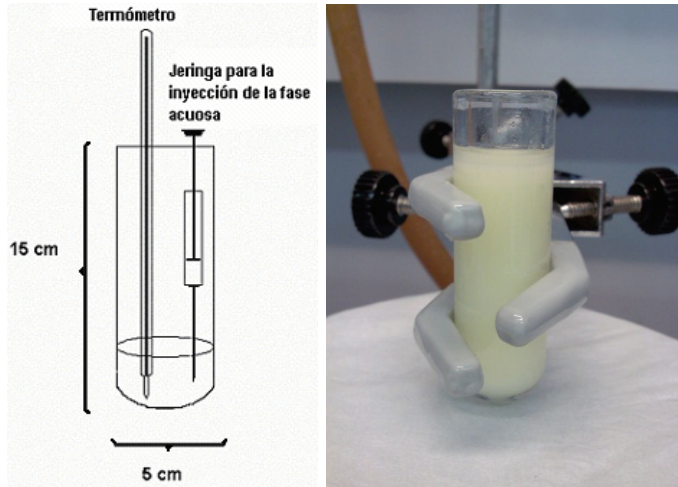


Figura 3.3.: Esquema del reactor para la preparación de micropartículas y fotografía del resultado final de la polimerización.

El tamaño de poro de la matriz polimérica está determinado por la cantidad de agente reticulante, disminuyendo el diámetro del poro al aumentar la cantidad de entrecruzante. El grado de reticulación η , viene dado por:

$$\eta = \frac{g_{\text{BIS}}}{g_{\text{BIS}} + g_{\text{monomero}}} \times 100 \quad [15]$$

donde Ar es la cantidad de agente reticulante y M la cantidad de monómero, expresadas ambas en gramos.

Debido a que en este trabajo se utilizaban diversos monómeros de distinto peso molecular y con el fin de poder realizar una comparación de los distintos biosensores para el cálculo del grado de reticulación se utilizó la fracción molar de los componentes. En estos casos el grado de reticulación se expresa a través de la ecuación:

$$\eta = \frac{n_{\text{BIS}}}{n_{\text{BIS}} + n_{\text{monomero}}} \times 100 \quad [16]$$

donde n_{BIS} y n_{monomero} son el número de moles de agente entrecruzante y monómero respectivamente.

Al final, se obtiene una matriz polimérica que atrapa las proteínas que se encuentren dentro del medio donde se realiza la polimerización, como las distintas enzimas que en este trabajo se han empleado. Interesa que el tamaño de poro sea lo suficientemente pequeño como para que la enzima no salga al exterior pero a la vez debe ser lo suficientemente grande para que el sustrato pueda difundir hacia el interior de la micropartícula permitiendo la reacción enzimática y para que el producto de dicha reacción, pueda salir del polímero y alcanzar la superficie electródica.

Los monómeros utilizados para la síntesis de micropartículas fueron acrilamida (AA), poli etilen glicol metil eter metacrilato (PEGMEM), dimetilamino etil metacrilato (DMAEM) y ácido metacrílico (AMA). En todos los casos se optó por la bisacrilamida como agente reticulante (Figura 3.4). Se han realizado síntesis de micropartículas con grados de reticulación comprendidos entre 1,6 y 8,0% en función del monómero y de la enzima utilizada.

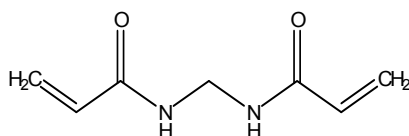
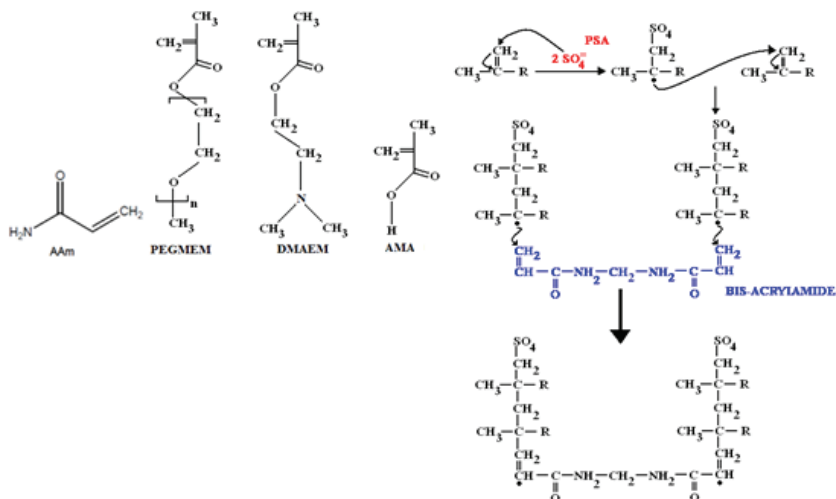


Figura 3.4.: Estructura de bisacrilamida

La reacción polimérica de los distintos polímeros utilizados con el agente reticulante se muestra en el Esquema 3.1.



Esquema 3.1.: Reacción de polimerización radicalaria entre los polímeros y el agente entrecruzante

En la Tabla 3.2 se muestra la composición de la emulsión de poliacrilamida utilizada en las síntesis para obtener micropartículas con distintos grados de reticulación.

η (%)	1,6	2,5	3,5	4,0	4,5	5,0	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
FASE EXTERNA (oleosa) 13,89 %											
Dodecano (líq)						450					
Span 80 (líq)						150					
FASE INTERNA (acuosa) 86,11 %											
Acrilamida (mg)						750					
Bisacrilamida (mg)	12,25	19,25	27,25	31,25	35,50	40,00	48,00	52,50	56,25	60,75	65,00
Disolución tampón (ml)						3					
PSA (mg)						7,5					
Enzima											
GlOx (14 UI/mg)							53,60	53,60	53,60	53,60	53,60
PPO (7500 UI/mg)	2,60	2,60	2,60	2,60	2,60	2,60					
ChOx (100 UI/mg)						22,90	22,90	22,90	22,90	22,90	22,90
ChOx (100 UI/mg) + AChE (349 UI/mg)									22,90 + 6,60		
TEMED (líq)						30					

Tabla 3.2.: Composición detallada de las fases acuosa y oleosa de la emulsión precursora

3.3.2. Preparación de los Biosensores

El éxito en estudios electroquímicos comienza asegurándose de que los sensores electroquímicos de que se disponen estén trabajando adecuadamente y que sus superficies electródicas no se encuentren contaminadas. El electrodo de referencia se recargaba con una disolución saturada de cloruro potásico. Se llevó a cabo la regeneración de los electrodos de platino, tanto auxiliar como de trabajo, llevándolos a potenciales alternos de -2V y +2V vs ECS, durante 30 s, repitiendo este paso 10 veces.

La limpieza efectiva de superficies electródicas que hemos utilizado como electrodos de trabajo, platino y carbón vítreo, se consigue a través de los tres procedimientos de limpieza que a continuación se detallan:

- i) **Limpieza química.** Este procedimiento se realiza cuando el electrodo ha sido modificado físicamente o químicamente con la finalidad de obtener una respuesta característica del biosensor. Dependiendo del material del electrodo se suele utilizar mezclas de reactivos que atacan y destruyen todo material orgánico que se encuentre depositado en la superficie de estos biosensores. Lo que se hace es sumergir el electrodo de interés en la mezcla de reactivos por un tiempo determinado. En el presente trabajo de investigación se procedió a sumergir el electrodo de platino en solución $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ (1/1) durante 30 segundos y al electrodo de carbón vítreo durante 10 segundos. Luego se lavan dichos electrodos con abundante agua desionizada.
- ii) **Limpieza mecánica.** Una vez que los electrodos fueron tratados químicamente se procede a pulir los electrodos utilizando alúmina sobre un paño fino. Durante este procedimiento de limpieza mecánica se utiliza agua desionizada 18 MΩ.
- iii) **Limpieza electroquímica.** Una vez cumplidos los procedimientos anteriores se procede a

realizar una limpieza electroquímica ciclando para ello al electrodo de trabajo durante una determinada cantidad de ciclos en una determinada solución, que por lo general consiste en una solución 0,1 M HClO_4 , utilizando la técnica de voltamperometría cíclica. Cuando la superficie electródica esta limpia ella exhibe un comportamiento electroquímico que es característico para cada material electródico.

Para la limpieza de los electrodos se utiliza un baño de ultrasonidos Cientifica

Para la preparación del biosensor se deposita una cantidad exactamente pesada de micropartículas con enzima inmovilizada en la superficie del electrodo de trabajo y se retienen con una membrana de diálisis, que permite la entrada del sustrato al interior de la micropartícula (Figura 3.5). Antes de su uso se mantiene en una disolución de fosfato sódico durante 24 horas y se conserva en dicha disolución a 4°C.

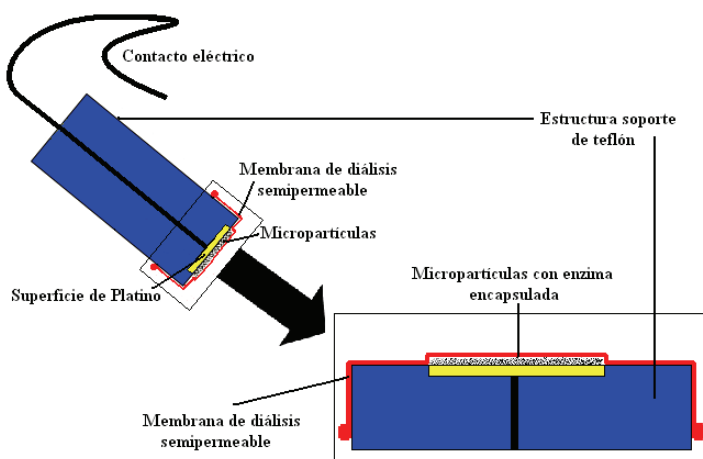


Figura 3.5.: *Diseño del biosensor amperométrico con micropartículas poliméricas*

3.3.3. Procedimiento de medida

Antes de realizar las medidas, se permite que el biosensor, que se guarda en una solución de tampón fosfato/acetato a -4°C , alcance la temperatura ambiente.

Los amperogramas se obtienen sumergiendo el biosensor en la célula de medida que contiene 10,0 ml del medio de trabajo de que se trate en cada caso, agitándose mecánicamente de forma constante. Se aplica el potencial deseado y se permite la estabilización de la corriente de fondo. Una vez estabilizada la corriente, se añade a la celda electroquímica una cantidad conocida de sustrato, que genera un aumento de la intensidad de corriente, como consecuencia de la reducción u oxidación del producto de la reacción enzimática, hasta llegar al estado estacionario donde la intensidad se mantiene constante. Se realiza una nueva adición de sustrato que da lugar a otro incremento en la intensidad de corriente, alcanzando de nuevo el estado estacionario (Figura 3.6). Así sucesivamente hasta que se llega a la concentración de saturación del enzima, situación en la que todos sus centros activos están unidos a moléculas de sustrato. La intensidad de corriente tendrá una relación directa con la concentración de sustrato.

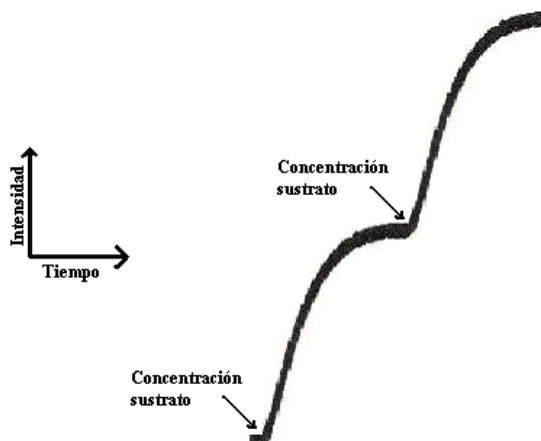


Figura 3.6.: Medida de la intensidad en condiciones de estado estacionario

No fue necesario aplicar ningún tipo de tratamiento, físico o químico al electrodo entre medidas.

La aplicación del potencial al electrodo de trabajo (biosensor), va a depender de la enzima con la que estemos trabajando, variando de -0,1 V (este potencial permite medir la reducción de la o-quinona, formada en la reacción enzimática cuando se usa tirosinasa) a +0,6 ó +0,7 V (para medir la oxidación del peróxido de hidrógeno formado en la reacción enzimática de las demás enzimas utilizadas).

El comportamiento de las enzimas inmovilizadas es diferente a la de las enzimas libres y la curva de calibrado obtenida no se ajusta totalmente a la ecuación de Michaelis-Menten, por lo que en términos cinéticos se habla de constante de Michaelis-Menten aparente (K_m ap.).

La intensidad de la corriente que se produce en el electrodo debido a la reducción u oxidación del producto enzimático, se relaciona con la ecuación de Michaelis-Menten que rige la cinética enzimática según la expresión:

$$i_k = \frac{i_{\max} [S]^n}{(K_m^n + [S]^n)} \quad [17]$$

Donde i_k es la intensidad medida para una concentración de sustrato determinada $[S]$, n es el índice de Hill de cooperatividad, K_m es la constante de Michaelis-Menten aparente e i_{\max} la intensidad máxima obtenida para una concentración de sustrato a saturación.

i_{\max} se define a su vez por un proceso controlado por la cinética enzimática como:

$$i_{\max} = \frac{nFA d K_{cat} [E_o]}{2} \quad [18]$$

donde F es la constante de Faraday, A el área del electrodo, d es el espesor de la capa de micropartículas, K_{cat} es la

constante catalítica, $[E_o]$ la cantidad de enzima y n el número de electrones que intervienen en la reacción.

3.3.4. Estudio de los parámetros analíticos del Biosensor

Los parámetros analíticos estudiados en todos los biosensores han sido sensibilidad, intensidad máxima, intervalo lineal, límite de detección, tiempo de respuesta y precisión. La sensibilidad se calcula a partir de la pendiente del intervalo lineal. Para el intervalo lineal se tomaron los valores de la curva de calibrado en la que la sensibilidad (pendiente) es constante, y que se corresponde con el mayor número de resultados que presentan un coeficiente de regresión igual o superior al 99%. El límite de detección de un analito se define como aquella concentración que proporciona una señal instrumental significativamente diferente de la señal de una muestra en blanco, o la señal de fondo. Es la cantidad de analito que proporciona una señal igual a la del blanco más tres veces la desviación estándar del blanco ($x_{LD} = \bar{X}_B + 3\sigma_B$). La intensidad máxima o intensidad alcanzada al producirse la saturación enzimática, se expresa en forma de densidad de corriente máxima en las tablas, relacionándolo con la superficie del electrodo. El tiempo de respuesta se estima mediante el tiempo que entre la adicción del analito y la obtención 95 % de la respuesta.

La evaluación de la precisión del método, es decir, el grado de aproximación entre los resultados obtenidos se puede realizar en términos de repetibilidad (variación de los resultados dentro del curso del mismo análisis), precisión intermedia (variación interdía) y reproducibilidad (ensayos interlaboratorio). En nuestro trabajo se han evaluado tanto la repetibilidad y precisión intermedia, expresadas mediante la medida del coeficiente de variación. En el caso de la repetibilidad, todas las condiciones deben ser idénticas, por eso, se realizaron 10 medidas a la misma concentración de sustrato (siempre cambiando la disolución electrolítica entre medida y medida), utilizando el mismo biosensor y todas realizándose el mismo día. Para efectuar este estudio se eligieron 3 niveles distintos de concentración de sustrato; la concentración más baja y más alta de la zona de intervalo lineal y una concentración

intermedia de dicho intervalo lineal. Para el estudio de precisión intermedia, se realizaron 10 medidas de intensidad al añadir una concentración de sustrato de la zona intermedia del intervalo lineal, con el biosensor utilizado para el estudio de repetibilidad, pero en distintos días. Los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos por Horwitz¹⁵⁵, el cual dedujo una ecuación empírica que muestra el aumento del coeficiente de variación a medida que disminuye la concentración del analito en estudio (Tabla 3.3).

$$CV(\%) = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad [19]$$

% analito	Coeficiente de variación (CV %)
100	2
10	2,8
1	4
0,1	5,7
0,01 - 0,0001	8 - 16
0,001	11,3

Tabla 3.3. *Coeficientes máximos de variación porcentuales esperables en función de la concentración a medir del analito*

Dentro de los parámetros cinéticos que se calculan, se encuentran el coeficiente de Hill, n (obtenido de la pendiente de la recta a partir de la representación logarítmica de la ecuación de Hill [20]) y la constante de Michaelis-Menten (obtenida a partir de la ecuación de Lineweaver-Burk [21]). En la ecuación de Hill representamos en abscisas el log de la concentración de sustrato expresada en log y en ordenadas el log de $V/(V_{\max}-V)$. El coeficiente de Hill es la pendiente de la recta obtenida y nos indica si la reacción enzimática se ajusta a una cinética de Michaelis-Menten, que sucede cuando el valor del coeficiente de Hill está lo más próximo a 1.

$$\log \frac{V}{V_{\max}-V} = n \log K_m - n \log S \quad [20]$$

¹⁵⁵ W. Horwitz, *Anal. Chem.*, **54**, 67 (1982).

Si este coeficiente de Hill se aleja de 1, significa que el proceso global del biosensor no se ajusta a una cinética de Michaelis-Menten, por lo que no se pueden calcular los parámetros correspondientes a la cinética enzimática implicada en el proceso. Esto sucede cuando el proceso de difusión resulta más lento que la reacción enzimática. Cuando sucede al contrario, se utiliza la ecuación de Lineweaver-Burk para el cálculo de la constante de Michaelis-Menten, K_m [20], representando en abscisas la inversa de concentración de sustrato y en ordenadas la inversa de intensidad obtenida, a partir de la ordenada en el origen se calcula el valor de V_{max} y a partir de la pendiente de la recta se calcula K_m

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{S} \quad [21]$$

4

RESULTADOS

Resumen

Investigaciones previas en nuestro grupo de investigación, realizaron el estudio de micropartículas de poliacrilamida con la enzima GOx inmovilizada para el diseño de biosensores amperométricos. Las micropartículas sintetizadas presentaron unas buenas características como sistemas de inmovilización ya que presentan una estabilidad en el tiempo superior a 1 año cuando se almacena a -4°C en tampón fosfato, y pueden ser utilizadas en ese periodo, se eligió este polímero para atrapar otras enzimas oxidoreductasas. Las propiedades, tanto fisicoquímicas como analíticas de los biosensores que utilizan como material biológico estas micropartículas, mejoran con respecto a las ya reportadas en la literatura. Por este motivo, el estudio en esta tesis comenzó con el empleo de micropartículas de poliacrilamida para el atrapamiento de otras enzimas oxidoreductasas. Debido a que dentro de nuestro grupo de investigación se había utilizado anteriormente la enzima GOx, se investigó en este trabajo el comportamiento en la inmovilización de otras enzimas oxidoreductasas, tales como GOx, PPO, ChOx y AChE.

Con el fin de realizar un estudio más extenso dentro de la búsqueda de nuevos materiales basados en polímeros hidrofílicos con nuevas propiedades, se planteó el estudio de otros polímeros diferentes a poliacrilamida para la síntesis de macropartículas. En consecuencia, durante la realización del trabajo de tesis, se han planteado la utilización de diferentes polímeros biocompatibles (poli etilenglicol metil éter metacrilato, poli dimetil amino etil metacrilato y poli ácido metacrílico) en forma de micropartículas para la inmovilización enzimática, utilizándose como parte biológica de un biosensor amperométrico enzimático para la determinación de glucosa.

4.1. “Biosensor amperométrico para la medida de galactosa compuesto por microgeles de poliacrilamida”. *Anales Real Academia Nacional de Farmacia*, 72: págs. 443-461 (2006)

La galactosemia es uno de los errores innatos del metabolismo más frecuentes, su presentación clínica en niños no tratados, puede ser severa, a veces mortal; su diagnóstico es relativamente simple y su tratamiento es muy sencillo y efectivo. Esto ha hecho que en los últimos años se hayan propuesto nuevos diseños de biosensores para la determinación de galactosa basados en galactosa oxidasa. Una de las principales aplicaciones de los biosensores compuestos por galactosa oxidasa, además del estudio de lactosa en leche y derivados, es el estudio del nivel de galactosa en sangre, ya que este parámetro tiene una gran importancia en química clínica para el análisis preventivo de la galactosemia. La galactosemia es una enfermedad en la cual la ausencia de la enzima galactosa fosfatouridil transferasa produce la incapacidad de utilizar el azúcar simple galactosa, que compone la mitad de la lactosa, el azúcar que se encuentra en la leche, esto provoca una acumulación de galactosa dentro del organismo, y como consecuencia, la aparición de lesiones en el hígado y en el sistema nervioso central.

El objetivo de este trabajo consistió en el desarrollo de un método de determinación de galactosa mediante el diseño de un biosensor electroquímico que utiliza como material biológico la enzima galactosa oxidasa inmovilizada en micropartículas de poliacrilamida.

La caracterización de las micropartículas con y sin enzima inmovilizada se llevó a cabo mediante diversos métodos fisicoquímicos, tales como analizador de partículas Galai Cis-1, microscopía electrónica de barrido, difracción de rayos X y calorimetría diferencial de barrido. Cabe destacar la alta protección que las micropartículas ejercen sobre el enzima, ya que la actividad de la enzima inmovilizada en las micropartículas permanece inalterada por un largo periodo de tiempo, mayor de 120 días con un 95% de la señal inicial.

Con el fin de optimizar las condiciones óptimas de análisis, se estudió la influencia de diversos factores en la respuesta del biosensor, tales como grado de reticulación, pH, temperatura. Se obtuvo un dispositivo analítico de alta sensibilidad para la detección de galactosa, realizándose la medida amperométrica en un tiempo de respuesta de 60 segundos.

————— *Artículo original* —————

Biosensor amperométrico para la medida de galactosa compuesto por microgeles de poliacrilamida

JUAN PABLO HERVÁS-PÉREZ¹, MARTA SÁNCHEZ-PANIAGUA
LÓPEZ², ENRIQUE LÓPEZ-CABARCOS²,
BEATRIZ LÓPEZ-RUIZ^{1*}

¹*Sección Departamental de Química Analítica. Facultad de Farmacia*

²*Departamento de Química-Física II. Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid*

RESUMEN

La galactosemia es uno de los errores innatos del metabolismo más frecuentes. Su presentación clínica en niños no tratados puede ser severa, a veces mortal; su diagnóstico es relativamente simple y su tratamiento es muy sencillo y efectivo. Esto ha hecho que en los últimos años se hayan propuesto nuevos diseños de biosensores para la determinación de galactosa basados en galactosa oxidasa. El objetivo del trabajo consistió en la inmovilización de galactosa oxidasa (GLOx) en micropartículas de poliacrilamida (PAA), sintetizadas a partir del método de emulsión concentrada, y su utilización como material biológico de un nuevo biosensor amperométrico para la determinación de galactosa. Para preparar los biosensores de galactosa se depositaron las micropartículas con galactosa oxidasa sobre la superficie de un electrodo de platino y se cubrieron con una membrana de diálisis. Las micropartículas se caracterizaron mediante un analizador de partículas Galai Cis-1, microscopía electrónica de barrido, difracción de rayos X y calorimetría de barrido diferencial. La temperatura de transición vítrea (T_g) de los microgeles de poliacrilamida disminuyó al encapsular en su interior galactosa oxidasa. Se estudió

* **Información de contacto:** Beatriz López-Ruiz.

Sección Departamental de Química Analítica. Facultad de Farmacia.
Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal, s/n. 28040 Madrid.
Teléfono: +34 913941756.
Fax: +34 913941751.
bealopru@farm.ucm.es

la influencia de distintos factores, tales como grado de reticulación, pH y temperatura en la respuesta del biosensor. Las condiciones óptimas se corresponden a un grado de reticulación del 7%, 40° C y pH 7,0. El sistema de inmovilización propuesto apenas modifica la actividad enzimática, pero parece proteger a la enzima aumentando el intervalo de temperatura en el que es activa.

Palabras clave: Emulsión concentrada.—Micropartículas.—Electrodo enzimático.—Galactosa oxidasa.

ABSTRACT

Amperometric biosensor based on polyacrylamide microgels for galactose determination

Galactosemia is one of the natural errors of the metabolism more frequent, its clinical representation in children not treated can be severe, sometimes mortal; its diagnostic is relatively simple and its treatment is very easy and effective. Hence, in last years new biosensors design for galactose determination based on galactose oxidase has been proposed. The aim of this work consists of the immobilization of galactose oxidase (GLOx) in polyacrylamide microparticles, using the concentrated emulsion method, and their use as biological material of a new amperometric biosensor for galactose determination. For preparing the galactose biosensors, microparticles with galactose oxidase were deposited on the surface of a platinum electrode and covered with a dialysis membrane. Microparticles were characterized by a Galai Cis-1 particle analyzer system, scanning electron microscopy, X-rays diffraction and differential scanning calorimetry. The presence of galactose oxidase decreases the transition temperature (Tg) of the polyacrylamide microgels. The influence of several experimental factors, such as crosslinking content, pH and temperature, on the biosensor response was investigated. The optimal performance of the biosensor takes place for a cross-linking of 7.0%, 40°C and pH 7.0. The proposed immobilization system almost does not modify the enzyme activity, but seems to protect to the enzyme because an increase of the temperature range in which the enzyme is active is observed.

Key words: Concentrated emulsion.—Microparticles.—Enzyme electrode.—Galactose oxidase.

INTRODUCCIÓN

Los biosensores amperométricos son dispositivos analíticos que presentan una gran aplicación en campos tales como la química clínica, la industria farmacéutica, la industria alimentaria, estudios medioambientales, etc. Su campo de aplicación está en expansión

gracias a algunas de sus propiedades como especificidad, selectividad, facilidad y rapidez de uso, intervalo de linealidad, posibilidad de miniaturización, bajo coste, etc. (1, 2, 3, 4). Los biosensores constan de un elemento biológico en íntimo contacto con un transductor responsable de la medida analítica. Para incrementar, a lo largo del tiempo, la estabilidad estructural y funcional del material biológico empleado en el diseño de biosensores, se emplean distintos métodos de inmovilización, que proporcionan un medio en el que el biomaterial se encuentra protegido. Uno de los sistemas de inmovilización más utilizados consiste en la encapsulación del material biológico dentro de una matriz polimérica (5, 6). A modo de ejemplo, la glucosa oxidasa se ha inmovilizado, con éxito, en electropolímeros (7, 8), hidrogeles (9, 10) y más recientemente en látex (11). En cuanto a la galactosa oxidasa se ha inmovilizado en electropolímeros (12, 13, 14), en diferentes películas poliméricas (15, 16, 17) e hidrogeles (18, 19). Una de las principales aplicaciones de los biosensores compuestos por galactosa oxidasa es el estudio del nivel de galactosa en sangre, ya que este parámetro tiene una gran importancia en química clínica para el análisis preventivo de la galactosemia, patología metabólica en los recién nacidos. La galactosemia es una enfermedad en la cual la ausencia de la enzima galactosa fosfatouridil transferasa produce la incapacidad de utilizar el azúcar simple galactosa, que compone la mitad de la lactosa, el azúcar que se encuentra en la leche, esto provoca una acumulación de galactosa dentro del organismo, y como consecuencia la aparición de lesiones en el hígado y en el sistema nervioso central.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Acrilamida, NN'-metilen-bis-acrilamida, galactosa y galactosa oxidasa (GLOx) (E.C.1.1.3.9) de *Dactylium dendroides* con una actividad de 14UI/mg de sólido fueron suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El persulfato de amonio (PSA), Span 80, NNN'-tetra-metil-etilen-diamina (TEMED) y dodecano por Fluka (Buchs, Switzerland). La membrana de diálisis con un corte de peso molecular (MWCO) comprendido entre 12.000 y 14.000 daltons por

Spectrum Medical Industries. Todos los reactivos fueron usados tal y como se recibieron. El agua utilizada fue de calidad Milli Q (Millipore, Milford, MA, USA).

Aparatos

Para el estudio morfológico de las micropartículas se utilizó un microscopio electrónico de barrido JOEL, modelo JSM-6400, que opera a 20KV y una magnificación de 5000. Con el analizador Galai Cis-1 se realizó el estudio del tamaño de las partículas. Los difractogramas se obtuvieron con un difractómetro Philips X'Pert modelo PW3050. Las medidas de calorimetría se llevaron a cabo con un calorímetro diferencial programado Mettler modelo 820. Para las medidas amperométricas se utilizó un potenciostato Metrohm modelo E-506 (Herisau, Switzerland), con una celda electroquímica termostatzada compuesta por tres electrodos; un electrodo de referencia (electrodo de calomelanos saturado), un electrodo auxiliar de barra de platino y un electrodo de trabajo de platino.

Síntesis de microgeles

La preparación de las micropartículas con galactosa oxidasa se realizó mediante el método de polimerización desde emulsión concentrada (20), siendo la fracción máxima de volumen $\Phi = 0,86$. Para estabilizar la emulsión W/O se utilizó el tensoactivo Span 80 (monooleato de sorbitol), con un coeficiente hidrofilia-lipofilia (HLB) de 4,3. El Span 80, junto con el dodecano, forma la fase oleosa. La fase acuosa está formada por una disolución reguladora de fosfato sódico 0,1M, pH 6,0, el monómero (acrilamida), el agente reticulante (NN'-metilen-bis-acrilamida) y el agente iniciador (PSA). Con el fin de eliminar el O₂ disuelto se pasó una corriente de N₂, tanto por la fase acuosa como por la fase oleosa. La formación de la emulsión concentrada se llevó a cabo mediante la inyección de la fase acuosa gota a gota sobre la fase oleosa. Este proceso se realizó bajo agitación magnética constante, obteniéndose finalmente una emulsión con aspecto lechoso. Una vez obtenida la emulsión se procedió a la polimerización, proceso que fue acelerado mediante la adición

de TEMED. El sistema se mantuvo bajo agitación continua durante 60 minutos, tiempo adecuado para completar la reacción de polimerización. Se procedió a la extracción de las micropartículas utilizando en primer lugar una disolución reguladora de fosfato sódico 0,1M frío, pH 6,0. El precipitado obtenido se lavó con acetona, y se centrifugó a 15.000 r.p.m. durante 15 minutos, obteniéndose un producto sólido, que se liofilizó durante 24 horas. Las micropartículas así obtenidas se conservaron a -4° C.

TABLA 1. Composición detallada de las fases acuosa y oleosa de la emulsión precursora

	$\eta = 6\%$	$\eta = 6,5\%$	$\eta = 7\%$	$\eta = 7,5\%$	$\eta = 8\%$
FASE EXTERNA (oleosa)					
Dodecano	450 μ l	450 μ l	450 μ l	450 μ l	450 μ l
Span 80	150 μ l	150 μ l	150 μ l	150 μ l	150 μ l
FASE INTERNA (acuosa)					
Acrilamida	750 mg	750 mg	750 mg	750 mg	750 mg
Bisacrilamida	45 mg	48,75 mg	52,5 mg	56,25 mg	60 mg
Disolución tampón pH 7,0	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
PSA	9 mg	9 mg	9 mg	9 mg	9 mg
Enzima GLOx (14 UI/mg)	53,6 mg	53,6 mg	53,6 mg	53,6 mg	53,6 mg
TEMED	30 μ l	30 μ l	30 μ l	30 μ l	30 μ l

El tamaño de poro de la matriz polimérica reticulada obtenida está determinado por la relación entre la cantidad de agente reticulante y la de monómero. La fracción de agente reticulante (grado de reticulación) en tanto por ciento viene dada por la expresión:

$$\eta = \frac{AR(g)}{AR(g) + M(g)} \times 100$$

donde AR es la cantidad de agente reticulante y M la cantidad de monómero expresadas ambas en gramos.

En la Tabla 1 se muestra la composición de las fases precursoras de la emulsión de poli(acrilamida) utilizada en la encapsulación de GLOx para cada grado de reticulación.

Preparación del biosensor amperométrico

El biosensor propuesto consta de dos partes: el transductor, formado por un electrodo de platino y el componente biológico, GLOx inmovilizada en el interior de las micropartículas de poli(acrilamida). Una cantidad exactamente pesada (3 mg) de estas micropartículas se pone en contacto con la superficie electródica, formando así una película uniforme alrededor de la misma. Mediante una membrana de diálisis de MWCO 12.000-14.000 D, las micropartículas se retienen en la superficie del electrodo de platino de forma que se permite el paso de la galactosa a través de sus poros. Un esquema de dicho biosensor se muestra en la Figura 1.

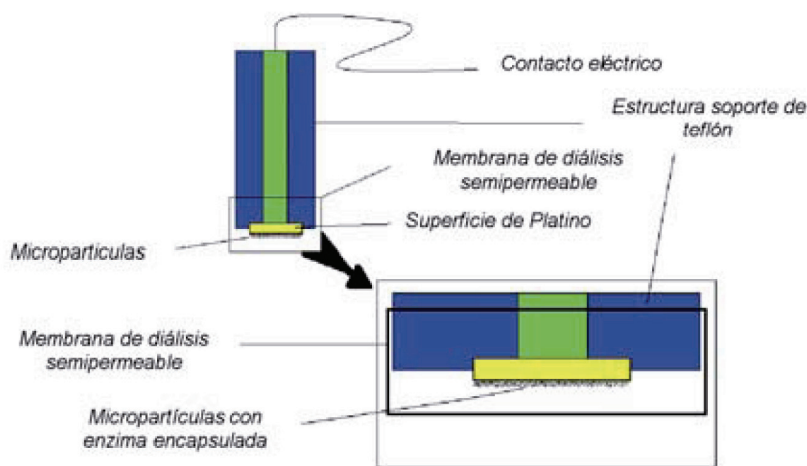


FIGURA 1. *Diseño del sensor amperométrico.*

RESULTADOS

Caracterización de las micropartículas con microscopía electrónica de barrido

En la Figura 2 se muestra la micrografía de micropartículas de poliacrilamida de grado de reticulación 7%, con GLOx en su interior.

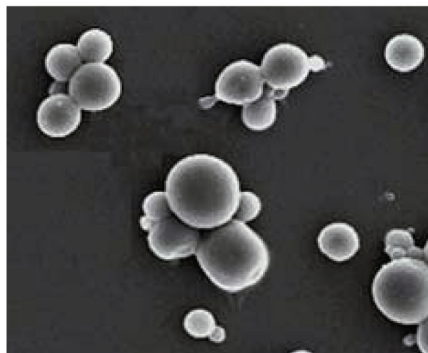


FIGURA 2. *Micrografía de micropartículas de poliacrilamida con GLOx, $\eta = 7\%$.*

Caracterización de las micropartículas con GALAI CIS-1

El estudio de tamaño de las micropartículas en agua se realizó mediante un analizador de tamaños Galai Cis-1. En la Figura 3 se representa la distribución de tamaños obtenida.

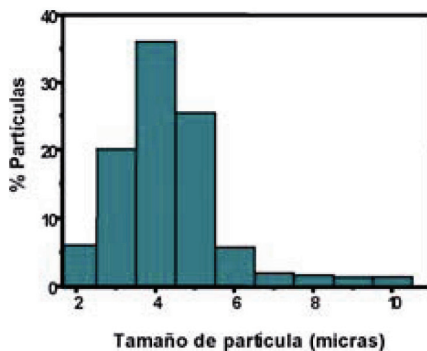


FIGURA 3. *Distribución de tamaños de las micropartículas en agua.*

Estudio de la temperatura de transición vítrea (T_g), del microgel

Además del tamaño de poro, otras propiedades del polímero, como la temperatura de transición vítrea (T_g), también se ven modificadas con la concentración de agente reticulante (20).

Este estudio se realizó mediante calorimetría de barrido diferencial (DSC). Para ello se tomaron micropartículas liofilizadas y se calentaron a 120° C durante 10 minutos. El contenido de agente entrecruzante de las micropartículas estudiadas varió entre 6% y 8%, próximo al valor óptimo para la inmovilización del enzima. La Figura 4a muestra el termograma obtenido con 4 mg de micropartículas de poliacrilamida (PAAm) con GLOx de $\eta = 7\%$, al someterlas a una velocidad de calentamiento de 10° C/min. En la Figura 4b se observa la relación entre T_g y el contenido de entrecruzante.

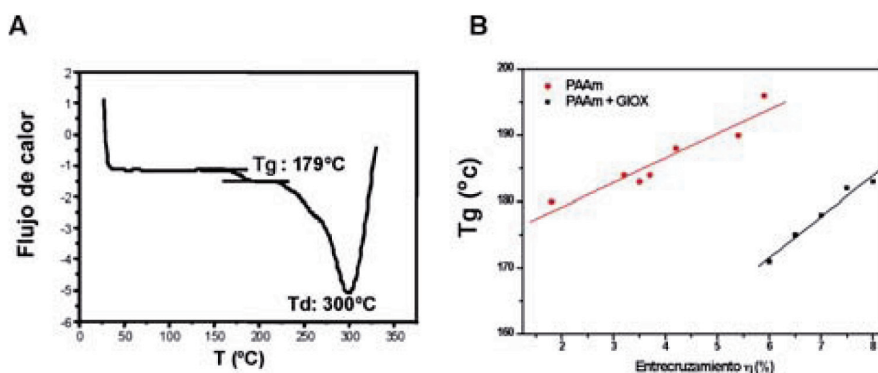


FIGURA 4. (A) Termograma obtenido con micropartículas de poliacrilamida con GLOx $\eta = 7\%$. Velocidad de calentamiento 10° C/min., peso muestra 4 mg. (B) Efecto del grado de reticulación en la temperatura de transición vítrea del microgel con y sin GLOx.

Difracción de rayos X

En la Figura 5 se muestra el difractograma obtenido con micropartículas de GLOx de $\eta = 7\%$. El espaciado d , correspondiente a estas reflexiones, se ha calculado utilizando la fórmula de Bragg.

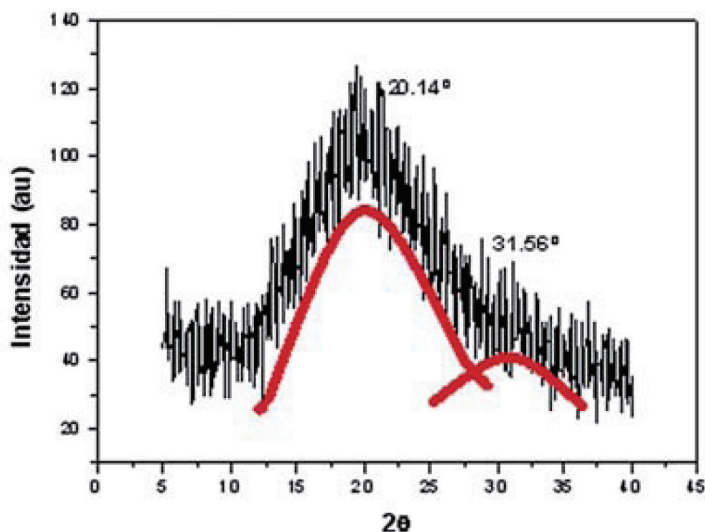
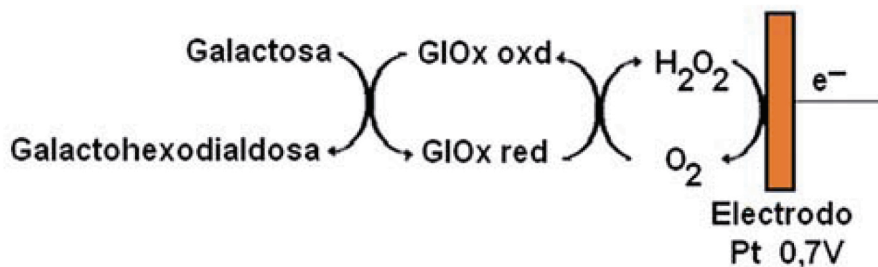


FIGURA 5. *Difractograma correspondiente a micropartículas de PAA con GlOx, $\eta = 7\%$.*

Diseño de un biosensor para la determinación de galactosa

Como se muestra en el siguiente esquema, al reaccionar la galactosa con la galactosa oxidasa se genera peróxido de hidrógeno que se oxida en el electrodo a un potencial de +0,7 V vs ECS, dando lugar a una corriente eléctrica que es proporcional a la concentración de galactosa en la disolución. En la Figura 6 se muestra el incremento y perfil de corriente producido al añadir galactosa a la disolución de tampón fosfato.



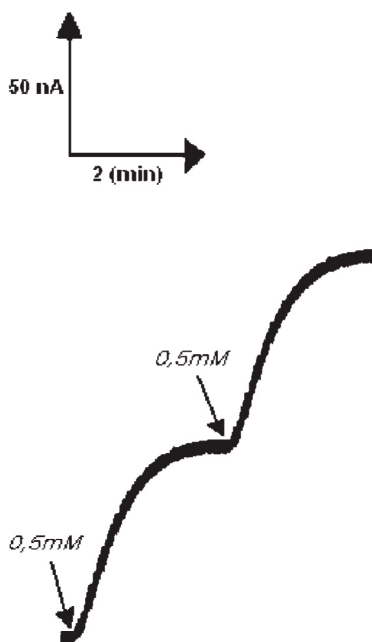


FIGURA 6. *Respuesta del biosensor a una concentración de galactosa 0,5 mM.*

Influencia del grado de reticulación de las micropartículas poliméricas

Para realizar este estudio se utilizaron micropartículas con distintos grados de reticulación (6; 6,5; 7; 7,5 y 8%). Se prepararon cinco biosensores con las diferentes micropartículas tomando en cada caso 3 mg de micropartículas. Se examinó la respuesta de estos biosensores en función de la concentración de galactosa añadida hasta llegar a la concentración de galactosa correspondiente a la saturación enzimática. Las adiciones de galactosa se realizaron sobre una disolución tampón de fosfato sódico 0,1M pH 6,0 y las medidas se llevaron a cabo a 25° C y + 0,7 V vs. ECS. En la Figura 7 se muestran las curvas de calibrado obtenidas con biosensores fabricados por micropartículas de distintos grados de reticulación. En la Tabla 2 se muestran las propiedades analíticas de dichos biosensores.

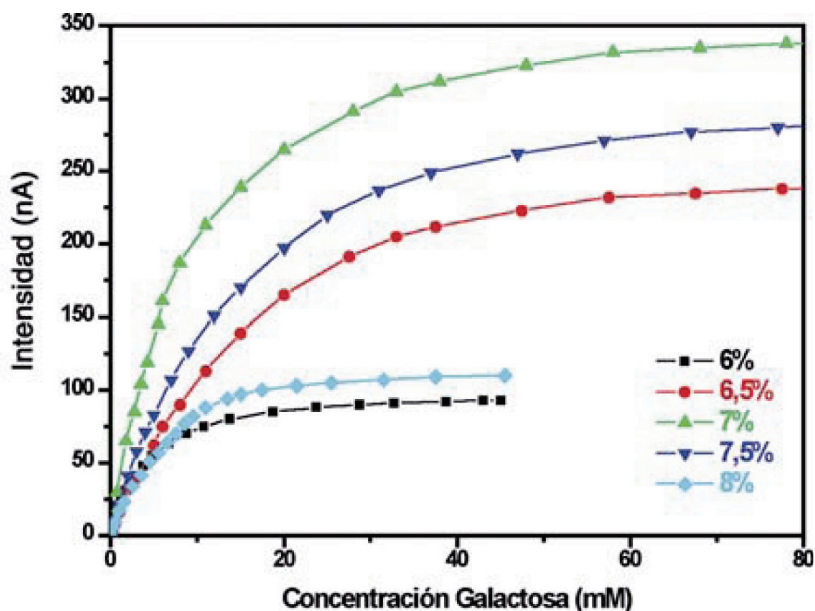


FIGURA 7. *Curvas de calibrado de los biosensores de galactosa para los distintos grados de reticulación. Condiciones experimentales: pH 6,0, 25° C y +0,7 V vs. ECS.*

Para comprobar si la reacción global del biosensor obedece a una cinética del tipo Michaelis-Menten se calculó el índice de Hill (n) a partir de la ecuación de Hill (21):

$$\log \left[\left(\frac{i_{max}}{i} \right) - 1 \right] = \log Km_{app} - n \log [S] \quad \text{Ecuación 1}$$

donde n es el grado de desviación de la reacción del biosensor de la cinética de Michaelis-Menten, de modo que cuanto más se desvíe dicho parámetro de la unidad menos se ajustará la cinética de la reacción global a una cinética de Michaelis-Menten.

En la Tabla 3 se recogen los valores del índice de Hill obtenidos para los distintos grados de reticulación.

TABLA 2. *Propiedades analíticas de los biosensores preparados con microgeles de distintos grados de reticulación*

η (%)	Sensibilidad (mA M ⁻¹ cm ⁻²)	J _{max} (μ A cm ⁻²)	Rango lineal (M)	r (n)	Límite de detección (M)
6,0	0,12	1,33	1,0 10 ⁻³ - 5,0 10 ⁻³	0,9914 (6)	5 10 ⁻⁴
6,5	0,16	3,29	1,0 10 ⁻³ - 6,0 10 ⁻³	0,9940 (5)	5 10 ⁻⁴
7,0	0,30	4,83	7,5 10 ⁻⁴ - 8,0 10 ⁻³	0,9955 (8)	9 10 ⁻⁴
7,5	0,17	4,09	2,0 10 ⁻³ - 9,0 10 ⁻³	0,9936 (6)	4 10 ⁻⁴
8,0	0,10	1,57	2,5 10 ⁻³ - 8,5 10 ⁻³	0,9960 (7)	5 10 ⁻⁴

TABLA 3. *Parámetros cinéticos de los biosensores formados por microgeles con distintos entrecruzamientos*

η (%)	Coficiente de Hill	Km _{app} (mM)
6,0	1,03	7,03
6,5	1,04	6,96
7,0	1,05	4,82
7,5	1,14	5,31
8,0	1,20	5,61

El cálculo de la Km se realizó a partir de las correspondientes representaciones de Lineweaver-Burk (22), utilizando los datos de la intensidad de corriente medida en el estado estacionario para sucesivas adiciones de sustrato hasta no obtener variación apreciable de la intensidad de corriente.

Influencia del pH

Este estudio se realizó con una disolución tampón acetato/fosfato de sodio 0,1M para el intervalo de pHs comprendido entre 4,0 y 8,0.

Respecto a las demás condiciones experimentales, se tomaron 3 mg de micropartículas con grado de reticulación $\eta = 7\%$, realizándose las medidas a 25°C y a $+0,7\text{ V}$ vs. ECS. En la Figura 8 se muestra la variación de la respuesta máxima relativa en función del pH.

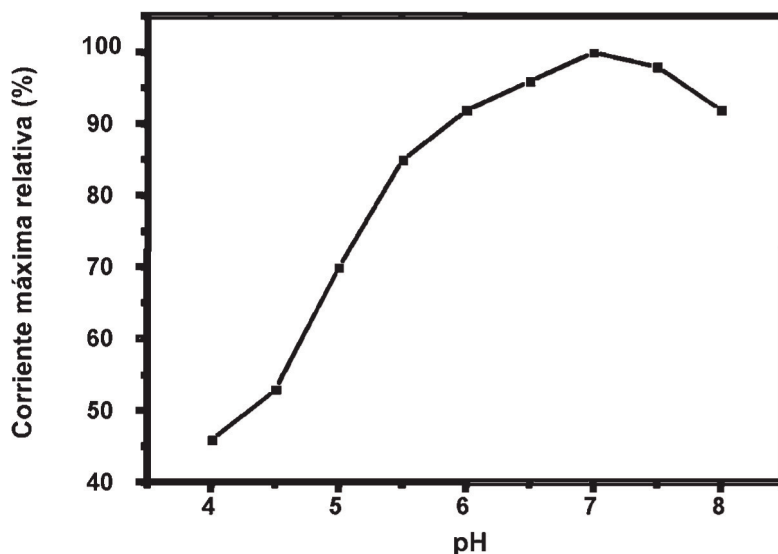


FIGURA 8. *Efecto del pH en la respuesta del biosensor. Condiciones experimentales: 0,1M galactosa, 25°C y $+0,7\text{ V}$ vs. ECS.*

Influencia de la temperatura

El estudio de la temperatura se realizó utilizando una celda electroquímica termostatzada. Para la preparación del biosensor se tomaron 3 mg de micropartículas de grado de reticulación $\eta = 7\%$; las adicciones de galactosa se realizaron sobre una disolución tampón de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7, y las medidas se hicieron a un potencial de $+0,7\text{V}$ vs. ECS (Figura 9a). En la Figura 9b se muestra la curva de Arrhenius.

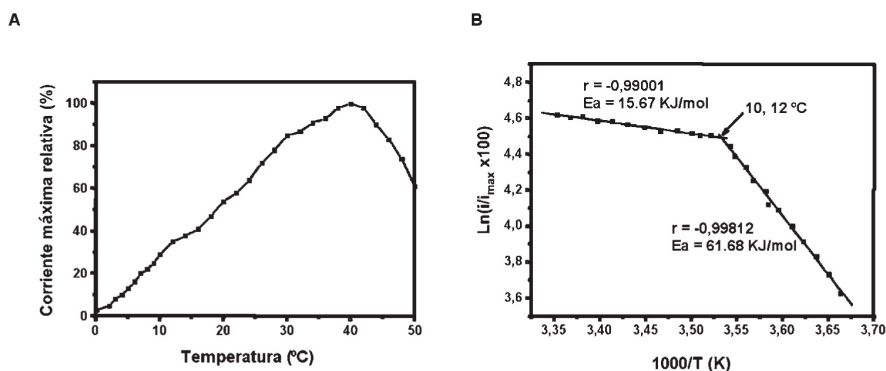


FIGURA 9. (A) Efecto de la temperatura en la respuesta del biosensor. (B) Curva de Arrhenius del biosensor elaborado con microgeles de $\eta = 7\%$. Condiciones experimentales: 0,1 M galactosa, pH 7 y + 0,7 V vs. ECS.

DISCUSIÓN

El estudio se inició con la caracterización de los microgeles usados como sistema de inmovilización de la GLOx, con el objetivo de investigar el efecto de incluir el enzima en el interior de una matriz polimérica en la estructura de dicha matriz.

Las micropartículas presentan forma esférica y gran polidispersidad, el 80% de ellas muestran un tamaño comprendido entre 3 y 5 micras.

La transición vítrea aparece en los polímeros amorfos y existe el criterio de que cualquier factor que dificulte la movilidad molecular de la cadena polimérica tiende a incrementar la Tg. Por ejemplo, el aumento de las fuerzas intermoleculares y del peso molecular del polímero, la rigidez y tamaño de las ramas y grupos laterales y también el aumento del grado de entrecruzamiento son factores que hacen que la Tg aumente.

En la Figura 4a se pueden ver con claridad dos procesos térmicos entre 20° C y 350° C. Primero se observa un salto en la capacidad calorífica a 179° C correspondiente a la transición vítrea del polímero seguido por un pico endotérmico alrededor de 300° C que se asocia con la descomposición del microgel.

Como era de esperar, se observa una dependencia lineal de la Tg con el grado de reticulación, ya que, aunque esta relación depende de varios factores como el número de moléculas entrecruzantes por gramo de monómero y el peso molecular del polímero (23), para contenidos de agente entrecruzante no muy grandes se puede aproximar a una relación lineal (24).

La Tg aumenta de forma lineal al aumentar el contenido de agente reticulante en el intervalo estudiado (Figura 4b) tanto en los microgeles vacíos como en los que contienen GLOx. Este cambio se puede describir por las siguientes expresiones:

$$\text{Micropartículas vacías: } T (^{\circ}\text{C}) = 171,9 + 3,9 \eta (\%)$$

$$\text{Micropartículas con GLOx: } T (^{\circ}\text{C}) = 169,9 + 6,9 \eta (\%)$$

Asimismo en la Figura 4b se observa como la Tg de las micropartículas de poliacrilamida sin enzima con distintos grados de reticulación (20) es siempre mayor que para aquellas micropartículas que poseen en su interior la enzima GLOx inmovilizada, al igual que ocurría con las micropartículas de PAA con glucosa oxidasa (20), aunque en este caso (GOx) el descenso observado en la Tg fue mayor, probablemente debido al mayor tamaño de la enzima.

Referente al estudio de las micropartículas mediante difracción de rayos X, se observan dos máximos anchos que son característicos de estructuras amorfas y que aparecen en este caso centrados alrededor de las posiciones $2\theta_1 = 20,14$ grados y $2\theta_2 = 31,56$ grados. Los valores medios de los espaciados obtenidos fueron $d_1 = 4,6$ Å y $d_2 = 2,98$ Å. No se observa ningún cambio de los espaciados al variar el contenido de agente entrecruzante, sólo pequeñas fluctuaciones que se atribuyen a las heterogeneidades que se forman dentro de los microgeles durante el proceso de polimerización, que son difíciles de reproducir. Glans y Turner (25) encontraron un valor de espaciado, en microgeles de PAA, de $4,15$ Å y observaron un aumento de este valor hasta $4,42$ Å al calentar el microgel. Por tanto, este espaciado d_1 parece corresponder con la distancia entre cadenas poliméricas. Por el contrario, el espaciado d_2 no se observa en microgeles sin enzima, por lo que pensamos debe estar relacionado con la presencia de galactosa oxidasa dentro del microgel y se corresponde con alguna característica estructural de la enzima.

El grado de reticulación permite establecer el valor óptimo al cual la enzima queda retenida sin que se vea afectada la difusión del sustrato (galactosa) hacia el interior de la micropartícula, permitiendo la reacción enzimática. La máxima respuesta se alcanza con 7%, este grado de reticulación da lugar a micropartículas en las que toda la enzima se retiene, hipótesis que se corroboró al no observar actividad enzimática en el líquido sobrenadante de lavado. Grados de reticulación menores dieron lugar a menores corrientes. Este resultado se explicaría si consideramos que cuando el grado de reticulación fue 6,5%, el microgel formado presenta un poro lo suficientemente grande como para que la enzima pueda atravesarlo, interpretación que quedó confirmada con la aparición de actividad enzimática en el líquido sobrenadante. Aún es mayor la pérdida para un grado de reticulación $\eta = 6\%$, y así se observa en la Figura 8, con un descenso apreciable en la corriente máxima. Cuando los valores son mayores que el óptimo, el descenso de la intensidad medida por el biosensor no se debería a una pérdida de enzima, sino a que la matriz generada es tan densa y el tamaño de poro es tan pequeño que además de ralentizar el acceso del sustrato a la micropartícula podría dificultar el contacto entre el sustrato y los centros activos del enzima. De acuerdo con estos resultados, los siguientes experimentos se realizaron con micropartículas de grado de reticulación 7%.

Como puede verse en la Tabla 3, los valores de índice de Hill obtenidos están muy próximos a la unidad para grados de reticulación de 6%, 6,5% y 7%, lo que nos indican que, en estos casos, la reacción global del biosensor se ajusta bastante a la cinética enzimática de Michaelis-Menten, y parece indicar que es la reacción enzimática la limitante frente a la difusión del sustrato a la superficie enzimática a través del microgel. En los casos en los que el valor de índice de Hill es significativamente superior a 1 (para grados de entrecruzamiento 7,5% y 8%) la etapa limitante de la reacción global del biosensor parece ser la difusión del sustrato, como era de esperar, ya que para esos grados de reticulación la matriz polimérica es tan densa que dificulta el movimiento del mismo.

Al estudiar el efecto del pH en la corriente generada en el biosensor se obtuvo la máxima respuesta a pH 7,0. Este valor de pH observado al inmovilizar la GLOx en micropartículas de poliacrilamida

coincide con el observado en otros sistemas de inmovilización enzimática propuestos por distintos autores (16, 26, 27).

Como muestra la Figura 9a, la máxima actividad enzimática se produce a una temperatura de 40° C y el intervalo donde la respuesta relativa es superior al 90% se sitúa entre 32 y 42° C. A partir de 42° C la actividad enzimática relativa disminuye, debido a que la GlOx comienza a desnaturalizarse. Según los valores encontrados en la literatura, Tressel et Kosman (28) encontraron la máxima actividad de la GlOx en disolución a 25° C, mientras que Gülce y colaboradores la sitúan en 35° C, disminuyendo cuando la temperatura supera 40° C (14). Según nuestros resultados, la desnaturalización de la enzima inmovilizada comienza a 40° C, temperatura superior a la que presenta esta enzima en disolución, lo que indica un efecto protector de la matriz del polímero en la actividad de la enzima.

En la curva de Arrhenius se observan dos tramos lineales. Las energías de activación (E_a) obtenidas a partir de las pendientes de dichas rectas fueron 15,7 KJ/mol y 61,9 KJ/mol. Las rectas se cortan a una temperatura de 10,12° C. Según las curvas de Arrhenius obtenidas con esta misma matriz polimérica al encapsular la enzima glucosa oxidasa y tirosinasa (29, 30), el cambio en la energía de activación observado a 10,12° C parece estar relacionado no tanto con cambios conformacionales del enzima con la temperatura, como aseguran algunos autores (31), sino a un cambio en el entorno del enzima y en concreto a cambios en el medio polimérico. La temperatura de cambio parece tener relación con la transición de volumen del polímero.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ministerio de Ciencia y Tecnología por la financiación de este trabajo a través del proyecto MAT2003-03051-C0303. Agradecer también a A. Rodríguez (Centro de Microscopía Electrónica, UCM) y Ester Gil Alegre (Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica) por su apoyo técnico y profesional.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) KULAGINA, N. V.; SHANKAR, L., MICHAEL, A. C. (1999): Monitoring glutamate and ascorbate in the extracellular space of brain tissue with electrochemical microsensors. *Anal. Chem.* 15: 5093-5100.
- (2) GUERRIERI, A., PALMISANO, F. (2001): An Acetylcholinesterase/Choline Oxidase-Based Amperometric Biosensor as a Liquid Chromatography Detector for Acetylcholine and Choline Determination in Brain Tissue Homogenates. *Anal. Chem.* 73: 2875-2882.
- (3) CRESPI, F. (2002): *In vivo* voltammetry and concomitant electrophysiology at a single micro-biosensor to analyse ischaemia, depression and drug dependence. *J. Neur. Met.*, 119: 173-184.
- (4) MOSER, I.; JOBST, G., URBAN, G. A. (2002): Biosensor arrays for simultaneous measurement of glucose, lactate, glutamate, and glutamine. *Biosens. Bioelectron.* 17: 297-302.
- (5) BENAS, B.; BENOIT, M. A., POULINE, O. (2000): Vaccine properties of antigens entrapped in microparticles produced by spray-drying technique and using various polyester polymers. *Vaccine.* 18: 1495-1505.
- (6) HILDEBRAND, G. E., TACK, J. W. (2000): Microencapsulation of peptides and proteins. *I. J. Pharm.* 196: 173-176.
- (7) COSNIER, S. (1999): Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. *Biosens. Bioelectron.* 14: 443-456.
- (8) ADELOJU, S. B., MOLINE, A. N. (2001): Fabrication of ultra-thin polypyrrole-glucose oxidase film from supporting electrolyte-free monomer solution for potentiometric biosensing of glucose. *Biosens. Bioelectron.* 16: 133-139.
- (9) BLANDINO, A.; MACIAS, M., CANTERO, D. (2001): Immobilization of glucose oxidase within calcium alginate gel capsules *Proc. Biochem.* 36: 601-606.
- (10) CALVO, E. J.; ETCHENIQUE, R.; PIETRASANTA, L.; WOLOSIOUK, A., DANILOWICZ, C. (2001): Layer-by-layer self-assembly of glucose oxidase and Os(Bpy)(2)CIP y CH₂NH-poly(allylamine) bioelectrode. *Anal. Chem.* 73: 1161-1168.
- (11) COSNIER, S.; SZUNERITS, S.; MARKS, R. S.; NOVOA, A.; PUECH, L.; PEREZ, E., RICOLATTES, I. (2001): A comparative physical study of two different hydrophilic synthetic latex matrices for the construction of a glucose biosensor. *Talanta.* 55: 889-897.
- (12) MANOWITZ, P.; STOECKER, P. W., YACYNICH, A. M. (1995): Galactose biosensors using composite polymers to prevent interferences. *Biosens. Bioelectron.* 10: 359-370
- (13) COCHE-GUERENTE, L.; COSNIER, S.; INNOCENT, C., MAILLEY, P. (1995): Development of amperometric biosensors based on the immobilization of enzymes in polymer films electrogenerated from a series of amphiphilic pyrrole derivatives. *Anal. Chim. Acta.* 311: 23-30.
- (14) GÜLCE, H.; ATAMAN, I.; GÜLCE, A., YILDIZ, A. (2002): A new amperometric enzyme electrode for galactose determination. *Enz. and Microb. Tech.* 30: 41-44.
- (15) SHARMA, S. K.; SINGHAL, R.; MALHOTRA, B. D.; SEHGAL, N., KUMAR, A. (2004): Lactose biosensor based on Langmuir-Blodgett films of poly(3-hexyl thiophene). *Biosens. Bioelectron.* 20: 651-657.

- (16) SHARMA, S. K.; SINGHAL, R.; MALHOTRA, B. D.; SEHGAL, N., KUMAR, A. (2004): Langmuir-Blodgett film based biosensor for estimation of galactose in milk. *Electrochim. Acta.* 49: 2479-2485.
- (17) EKINCI, E., PAŞAHAN, A. (2004): Poly (4-methoxyphenol) film as a galactose-sensing material. *Eur. Pol. J.* 40: 1605-1608.
- (18) YANG, Y.; MU, S., CHEN, H. (1998): Electrochemical synthesis of polypyrrole for the immobilization of galactose oxidase. *Synth. Metals.* 92: 173-178.
- (19) BRAHIM, S.; NARINESINGH, D., GUISEPPI-ELI, A. (2002): Bio-smart hydrogels: co-joined molecular recognition and signal transduction in biosensor fabrication and drug delivery. *Biosens. Bioelectron.* 17: 53-59.
- (20) RUBIO, RETAMA, B. J.; LÓPEZ-CABARCOS, E. J., LÓPEZ-RUIZ, B. (2003): Microstructural modifications induced by the entrapped glucose oxidase in cross-linked polyacrylamide microgels used as glucose sensors. *Biomaterials.* 24: 2965-2973.
- (21) IWUOHA, E. I.; ADEYOJU, O.; DEMPSEY, E., SMUTH, M. R. (1995): Investigation of the effects of polar organic solvents on the activity of tyrosinase entrapped in a poly(ester-sulphonic acid) polymer. *Biosens. Bioelectron.* 10: 661-667.
- (22) DIXON, M., WEBB, E. C. (1979): *Enzymes*. 3rd edition, p. 92-93. Academic Press. New York.
- (23) GONZÁLEZ-SÁIZ, J. M.; FERNÁNDEZ-TORROBA, M. A., PIZARRO, C. (1999): Study by response surface methodology of the swelling kinetic of weakly basic polyacrylamide gels in water. *Eur. Pol. J.* 35: 509-516.
- (24) DIMARZIO, E. A. (1964): Nature of the glass transition and the glassy state. *J. Res. Natl. Bur. Stds.* 68A: 611.
- (25) GLANS, J. H., TURNER, D. T. (1981): Glass transition elevation of polystyrene by crosslinks. *Polymer.* 22: 1540-1543.
- (26) SZABÓ, E. E.; ADÁNYI, N.; VÁRADI, M. (1996): Application of biosensor for monitoring galactose content. *Biosens. Bioelectron.* 11: 1051-1058.
- (27) TRÁČ, J.; NAVRÁTIL, M.; ŠTURDIK, E., GEMEINER, P. (2001): Monitoring of dihydroxyacetone production during oxidation of glycerol by immobilized *Gluconobacter oxydans* cells with an enzyme biosensor. *Enz. and Microb. Tech.* 28: 383-388.
- (28) TRESSEL, P. S., KOSMAN, D. J. (1982): Galactose oxidase from *Dactylium dendroides*. *Meth. Enzymol.* 89: 163-171.
- (29) RUBIO RETAMA, B. J.; LÓPEZ-RUIZ, B.; LÓPEZ-CABARCOS, E. J. (2005): High stability amperometric biosensor based on enzyme entrapment in microgels. *Talanta.* 68: 99-107.
- (30) HERVÁS PÉREZ, J. P.; SÁNCHEZ-PANIAGUA LÓPEZ, M.; LÓPEZ-CABARCOS, E.; LÓPEZ-RUIZ, B. (2006): Amperometric tyrosinase biosensor based on polyacrylamide microgels. *Biosens. Bioelectron.* 22: 429-439.
- (31) COSNIER, S.; SZUNERITS, S.; MARKS, R. S.; NOVOA, A.; PUECH, L.; PÉREZ, E.; RICOLATTES, I. (2001): A comparative physical study of two different hydrophilic synthetic latex matrices for the construction of a glucose biosensor. *Talanta.* 55: 889-897.

4.2. “Amperometric biosensors based on choline oxidase entrapped in polyacrylamide microgels”. Biosensor amperométrico formado por colina oxidasa inmovilizada en microgeles de poliacrilamida. *Electroanalysis*, 19 (2-3), págs. 370-378 (2006)

La acetilcolina es el neurotransmisor específico de la sinapsis, tanto del sistema nervioso somático como en la sinapsis ganglionar del sistema nervioso autónomo y en los órganos diana de la división parasimpática. La síntesis de acetilcolina tiene lugar en el botón terminal y es metabolizada por la acetilcolinesterasa en el espacio sináptico. La acetilcolina y su metabolito colina han sido asociados a procesos como la formación de la memoria y el aprendizaje, o el desarrollo y mantenimiento de las adicciones. Además, se han relacionado con trastornos cerebrales como el Alzheimer y el Parkinson, demencia progresiva y esquizofrenia. Por estas razones, la determinación de la acetilcolina y la colina es de gran importancia clínica. Además, el aumento del nivel de acetilcolina debido a la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), está siendo utilizado como estrategia terapéutica para combatir el Alzheimer. Los organofosforados y carbamatos son inhibidores de la colinesterasa, enzima que cataliza la hidrólisis de los ésteres del neurotransmisor acetilcolina. Los organofosforados se unen a la acetilcolinesterasa e inhiben su actividad de manera irreversible, tanto en los glóbulos rojos como en el plasma, por lo cual su restauración depende de la síntesis de nuevas moléculas de la enzima, a diferencia de los carbamatos en los que esta unión es reversible de manera espontánea.

Este trabajo consistió en el desarrollo de biosensores amperométricos para la detección de colina, acetilcolina y nicotina, mediante el desarrollo de biosensores mono y bienzimáticos. La inmovilización de colina oxidasa en micropartículas de poliacrilamida se realizó a partir del método de polimerización en emulsión concentrada utilizando bisacrilamida como agente entrecruzante. El atrapamiento conjunto de ChOx y AChE en las micropartículas requirió un paso previo de tratamiento con

glutaraldehído. Se realizó la caracterización fisicoquímica de las micropartículas sintetizadas para estudiar el efecto de la inmovilización enzimática así como la variación del entrecruzamiento de la red en las propiedades del microgel.

El biosensor monoenzimático desarrollado se utilizó para la detección de colina y el biosensor bienzimático para la detección de acetilcolina, obteniéndose, después del estudio y optimización de los factores que influyen en la respuesta analítica, una sensibilidad y límite de detección aceptables. La detección de nicotina se basó en el efecto inhibitorio que este compuesto ejerce sobre la actividad catalítica de colina oxidasa. Los coeficientes de variación obtenidos para la repetibilidad y para la precisión para una concentración de nicotina de 0,01 mM fueron 5,56 y 7,96% respectivamente.

Full Paper

Amperometric Biosensors Based on Choline Oxidase Entrapped in Polyacrylamide Microgels

M. Sánchez-Paniagua López,^a J. P. Hervás Pérez,^b E. López-Cabarcos,^a B. López-Ruiz^{b*}

^a Departamento de Química-Física II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^b Sección Departamental de Química Analítica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain
*e-mail: bealopru@farm.ucm.es

Received: July 21, 2006

Accepted: November 22, 2006

Abstract

A choline amperometric biosensor has been designed using as biological component choline oxidase (ChOx) entrapped in polyacrylamide microgels. The working electrode was prepared by holding the enzyme loaded microgels on a platinum electrode by a dialysis membrane. It was found that the optimum microgel cross-linking required to retain ChOx and to allow the diffusion of choline was 7.0%. The response of the biosensor was optimized in relation to pH, temperature and working potential and the following optimal values were obtained: pH 9.0, temperature range between 20 and 30 °C, and potential + 0.6 V. Under optimal conditions the sensitivity for choline was 17.45 mA M⁻¹ cm⁻², the detection limit 8 µM, and the response linear range from 2 × 10⁻⁵ M to 2 × 10⁻⁴ M. This biosensor has been also used as a nicotine detector due to the inhibition of the catalytic activity of choline oxidase by this compound. Moreover, the simultaneous entrapment of a second enzyme, acetylcholinesterase (AChE), in the microgels makes the biosensor sensible to acetylcholine.

Keywords: Amperometric biosensor, Choline oxidase, Acetylcholinesterase, Polyacrylamide microgels, Choline, Acetylcholine, Nicotine

DOI: 10.1002/elan.200603742

1. Introduction

Acetylcholine and its metabolite choline are neurotransmitters that play important roles in the brain chemistry [1]. Both neurotransmitters have been associated to processes such as memory formation and learning, or the development and maintenance of addictions. Furthermore, they have been related to brain disorders such as Alzheimer's and Parkinson diseases [2, 3], progressive dementia [4] and schizophrenia [5]. For these reasons the determination of acetylcholine and choline is of great clinical importance [6] and several methods of analysis have been developed in the past decades. Most of the analytical methods used to determine other neurotransmitters (e.g., catecholamines) are useless for these compounds, because both analytes are not electroactive, they lack fluorescence and are UV-inactive, hence methods based on the conversion of acetylcholine and choline into easily detectable compounds are usually employed. Liquid chromatography has been proved to be one of the most suitable methods to their analysis, with different detection modes as postcolumn suppression conductivity detection [7], electrospray ionization mass spectrometry [8] or electrochemical detection [9, 10]. Frequently, detection is further complicated by the complexity of the biological fluids in which acetylcholine and choline are found, and highly selective analytical techniques with low detection limits are necessary.

Biosensors constitute an attractive alternative for the determination of these compounds. Some of their properties such as specificity, precision, easiness and speed of use, wide linearity range, possibility of miniaturizing [11–13] have already been developed in carbon-paste electrodes [14, 15], platinum electrodes [16], graphite composite electrodes [17], carbon nanotubes electrodes [18], screen-printed electrodes [19, 20] and can be of application in acetylcholine and choline detection. The immobilization of the enzyme is the most critical step in biosensor preparation. Different methods have been employed to provide an environment where the enzyme is protected and the structural and functional stability of the biomaterial increased. Enzyme entrapment in polymeric matrices (films or microparticles) [21, 22] exhibiting pores through which the substrate might diffuse has demonstrated to be of interest in biosensors. In the microencapsulation process, the enzyme is entrapped in an inert three-dimensional polymer network providing larger enzyme loading than simple adsorption or covalent grafting. The microencapsulation has several advantages like: a) the preparation is chemically simple, b) the enzyme is protected against biodegradation and contamination by the polymeric matrix, which increases the biosensor lifetime, c) easy manipulation. Thus, choline oxidase (ChOx) and acetylcholinesterase (AChE) have been immobilizing in electropolymers [14, 16, 20, 23, 24] and hydrogels [25–27].

4.3. “The application of methacrylate-based polymers to enzyme biosensors”. Aplicación de polímeros metaacrílicos al diseño de biosensores amperométricos. *Biomolecular Engineering*, 23, págs. 233-245 (2006)

Este trabajo de revisión sirvió como base para la elección de los derivados del metacrilato como matrices poliméricas y su uso como sistema de inmovilización.

El objetivo en esta parte del trabajo consiste en examinar el uso de metacrilato y sus derivados, tales como poli(2-hydroxyethyl metacrilato) (pHEMA), poli(glicidil metacrilato) (pGMA), poli(butil metacrilato) (pBMA), poli(metacrilato de metilo) (pMMA), como sistemas de inmovilización enzimática para la preparación de electrodos y su uso en biosensores amperométricos, ópticos etc., así como su uso en bioreactores.

El estudio de las distintas matrices poliméricas permitió la elección de los distintos metacrilatos que posteriormente fueron elegidos como matrices poliméricas para la inmovilización de la glucosa oxidasa y su posterior utilización como material biológico en el desarrollo de biosensores amperométricos para la determinación de glucosa.



Available online at www.sciencedirect.com



Biomolecular Engineering 23 (2006) 233–245

**Biomolecular
Engineering**

www.elsevier.com/locate/genecanbioeng

Review

The application of methacrylate-based polymers to enzyme biosensors

J.P. Hervás Pérez^a, E. López-Cabarcos^b, B. López-Ruiz^{a,*}

^aSección Departamental de Química Analítica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain

^bDepartamento de Química-Física II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

Received 23 December 2005; received in revised form 19 June 2006; accepted 19 June 2006

Abstract

Enzyme electrodes based on methacrylates have received significant attention in the development of biosensors. This article reviews the use and application of methacrylate and its derivatives as an immobilization system for the preparation of enzyme electrodes. Recent examples, extracted from the literature, illustrate the superior performance of such materials in the fabrication of biosensors and bioreactors.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Enzyme electrode; Enzyme immobilization; Methacrylate derivatives; Biosensors; Hydrogels

Contents

1. Introduction	234
2. Methacrylates derivatives	234
2.1. Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA)	234
2.2. Poly(glycidyl methacrylate) (pGMA)	234
2.3. Poly(butyl methacrylate) (pBMA)	234
2.4. Poly(methyl methacrylate) (PMMA)	235
3. Amperometric biosensors	235
3.1. Amperometric biosensors based on glucose oxidase	235
3.2. Amperometric biosensors based on cholinesterases	236
3.3. Amperometric biosensors based on other enzymes	237
3.4. Amperometric biosensors based on conducting and redox polymers	238
4. Optical biosensors	239
5. Bioreactors based on methacrylate derivatives	240
6. Enzyme immobilization system based on methacrylate derivatives	241
Acknowledgement	243
References	243

Abbreviations: ABTS, 2,2'-azino-bis[3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonic acid]; AChE, acetyl cholinesterase; AIBN, 2,2'-azobis(isobutyronitrile); ARTF, atom-transfer radical polymerization; AS, aldicarb; BChE, butylcholinesterase; BMA, butyl methacrylate; BTC, 4-(benzoyl-benzyl)-trimethylammonium chloride; CB, Cibacron Blue F36A; CF, carbofuran; ChOx, cholesterol oxidase; ChOx, choline oxidase; CL, carbaryl; DEAEM, diethylaminoethyl methacrylate; DMAEMA, dimethylaminoethyl methacrylate; DMPP, dimethoxy-2-phenylacetophenone; DVB, divinyl benzene; EG, ethylene glycol; EGDMA, ethylene glycol dimethacrylate; Epi, epichlorohydrin; Fc, ferrocene; GDH, glucose dehydrogenase; GMA, glycidyl methacrylate; GMDA, glycidyl methacrylate-co-1,3-dimethacrylate; GOx, glucose oxidase; HEMA, 2-hydroxyethyl methacrylate; HMDA, hexamethylenediamine; HRP, horseradish peroxidase; ISFET, ion-selective field-effect transistors; LPO, lactoperoxidase; MAH, *N*-methacryloyl-L-histidinemethyl ester; MAPA, 2-methacrylamidophenylalanine; MMA, methyl methacrylate; MPC, 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine; NADP⁺, nicotinamide adenine dinucleotide; PEGDMA, polyethylene glycol monomethacrylate; pBMA, polybutyl methacrylate; pGMA, polyglycidyl methacrylate; pHEMA, poly(2-hydroxyethyl methacrylate); PMB, polymyxin B; PMBN, *p*-nitrophenyloxycarbonyl polyethylene glycol methacrylate; pMMA, polymethyl methacrylate; PPO, tyrosinase; PPy, polypyrrole; Py, pyrrole; SOx, sulphite oxidase; TEGDA, tetraethyleneglycol diacrylate; TEGDMA, tetraethyleneglycol dimethacrylate; *T_g*, glass transition temperature; VCA, vinylene carbonate; VGG, 4-vinylbenzyl chloride

* Corresponding author. Tel.: +34 91 394 1756; fax: +34 91 394 1754.

E-mail address: bealopru@farm.ucm.es (B. López-Ruiz).

1389-0344/\$ – see front matter © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.bioeng.2006.06.003

1. Introduction

The use of methacrylate hydrogels in biomedicine and biotechnology has made remarkable progress in the last decades. After the pioneer work developed in the 1960s (Wichterle and Lim, 1960) methacrylate hydrogels have been applied in drug delivery systems, contact lenses, food technology, quality control systems and synthetic membranes for biosensors (Yang et al., 1998; Blandino et al., 2001; Calvo et al., 2001; Brahim et al., 2002a,b,c,d; Marquette and Blum, 2003; Kok and Hasirci, 2004).

Methacrylate monomers consisting of an alkyl group, an acrylate ester group, and a functional carboxyl group can react with a wide range of monomers and functionalized molecules providing flexible polymer chains. Alkyl methacrylates are clear and volatile liquids, that are slightly soluble in water and highly soluble in alcohols, ethers, and organic solvents (Wright, 1981; Braden et al., 1997; Parker et al., 1998). Methacrylate hydrogels are prepared by interconnecting the lineal polymeric chains with cross-linkers establishing a three-dimensional network of strong chemical bonds. The beginning of polymerization requires thermal, photochemical, free radical or ionic activation of the monomers (Doretto et al., 1999; Bean et al., 2005a,b). There are two types of polymerization used in the preparation of methacrylate hydrogels: (a) addition polymerization (free radical polymerization) initiated by free radical initiators such as 2,2'-azino-bis[3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonic acid] (AIBN) or dimethoxyl-2-phenylacetophenone (DMPP) (Doretto et al., 1999; Bayramoğlu et al., 2002; Konno et al., 2004; Bean et al., 2005a,b), and (b) bulk polymerization (solution polymerization) used to prepare monolithic blocks.

Frequently, methacrylate hydrogels are made up with two different monomers giving copolymers whose properties depend on the nature and concentration of the monomers (Bayramoğlu et al., 2002; Kim et al., 2005), the polymerization conditions and the reactivity of the functional groups involved in polymerization (Brahim et al., 2002a,b,c,d; Bayramoğlu et al., 2005; Kim et al., 2005).

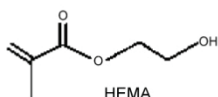
The aim of this work is to review different methacrylate derivatives used for enzyme immobilization in biosensors.

2. Methacrylates derivatives

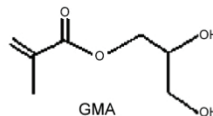
Different methacrylate monomers used to prepare hydrogels for enzymatic immobilization are described in this section.

2.1. Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA)

The 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA, Scheme 1) is a hydrosoluble monomer that polymerizes at low temperature (from -20 to $+10$ °C) allowing the immobilization of



Scheme 1. The chemical structure of 2-hydroxyethyl methacrylate monomer.



Scheme 2. The chemical structure of glycidyl methacrylate monomer.

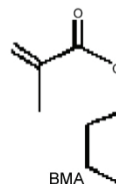
biological molecules and enzymes that, otherwise, will be denatured. The presence of hydroxyethyl groups in the polymer backbone confers high hydrophilicity and good biocompatibility to the material (Klomp et al., 1983). In addition, these groups can be used to prepare new monomers. The hardness of the polymer, pHEMA, can be easily modified by varying the amount of water during the preparation of the hydrogel, and its use as matrix in enzyme immobilization has been demonstrated successfully (Yoshida and Kaetsu, 1981; Kamakura et al., 1983; Arica and Hasirci, 1987; Doretto et al., 1994; Arica et al., 1998; Schulz et al., 1999). The above properties makes of pHEMA the methacrylate-immobilization support most frequently used in enzyme electrodes. Furthermore, copolymerization of HEMA with other monomers yields hydrogels of varying physical and chemical properties such as the degree of swelling, the mechanical strength, the optical properties and the oxygen permeability (Ratner and Hoffman, 1976; Montheard et al., 1992).

2.2. Poly(glycidyl methacrylate) (pGMA)

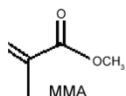
The glycidyl methacrylate monomer (GMA, Scheme 2), containing acrylic and epoxy groups, offers a dual functionality and gives the user freedom and flexibility in polymer design (Lee et al., 2001; Yang et al., 1999). The acrylic group allows copolymerization with other vinyl monomers in aqueous and non-aqueous systems (Simms, 1961). The epoxy group enables (i) cross-linking reactions with amines, carboxylic acids, anhydrides and hydroxyl-containing polymers (Zdyrko et al., 2006), and (ii) allows structural modification of the polymer backbone (Chen and Lee, 1999). For example, copolymerization with selected comonomers provides an easy control of the glass transition temperature (T_g) and solution viscosity (Safa and Nasirtabrzi, 2005).

2.3. Poly(butyl methacrylate) (pBMA)

Hydrogels prepared with butyl methacrylate (BMA, Scheme 3) posses hydrophobic domains suitable for accommodating



Scheme 3. The chemical structure of butyl methacrylate monomer.



Scheme 4. The chemical structure of methyl methacrylate monomer.

hydrophobic biomolecules (Oliveira-Cardoso and Galembeck, 1998). In aqueous media or physiological conditions, the hydrophobic alkyl groups spontaneously aggregated with the BMA units located at the interface showing properties of polymer colloids (Be' al and Chevalier, 2005; Nam et al., 2004).

2.4. Poly(methyl methacrylate) (pMMA)

Poly(methyl methacrylate) (pMMA, Scheme 4) is a clear, colourless polymer extensively used for optical applications (Kim, 2005; Jiu et al., 2006). The optical properties of pMMA such as colorimetric changes, luminescence effects and light refraction changes are widely used in fibre optic sensors and optical waveguides or claddings. However, pMMA alone is an inactive material and to fabricate a fibre optic sensor, a composite polymer with an opto-active sensing element entrapped within the polymer matrix has to be prepared. An important property of pMMA is the T_g , which is strongly influenced by the tacticity of the polymer, i.e. the placements of the ester and methyl groups along the polymer backbone (Chen and Lee, 1999; Ferriol et al., 2003). Other outstanding properties of pMMA include weather and scratch resistance (Martínez-Hernández et al., 2005), and good degree of compatibility with human tissues (Douglas and Bates, 1978; Craig, 1991; Murray and Darvell, 1993; Sarac et al., 2006). Because of its properties, pMMA is frequently used in chemical sensors (ion, gas, humidity and enzyme sensors) (Chatzandroulis et al., 2004a,b, 2005).

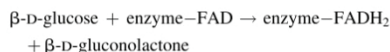
3. Amperometric biosensors

An amperometric biosensor is an analytical device that incorporates biological material immobilized on the surface of a suitable transducer (electrode) whose function is to produce a current when selective recognition of a given analyte occurs and a potential is applied between the electrodes. In this section, amperometric biosensors based on enzyme immobilization in methacrylate matrixes reported in the literature are summarized.

3.1. Amperometric biosensors based on glucose oxidase

Glucose biosensors have attracted great interest because of the increasing incidence of diabetes in the population of developed countries (Chinnayelka and McShane, 2004; Malhotra and Chaubey, 2003). Besides, glucose oxidase (GOx; EC 1.1.3.4) is a very robust enzyme that is often used as model for testing and developing new immobilization systems. Different matrixes, such as polymer films, polymer gels, and conducting polymers, have been assayed for glucose

oxidase immobilization, and for developing glucose biosensors (Cen et al., 2003; Suzuki et al., 2004; Liu et al., 2004). GOx catalyzes the oxidation of D-glucose to generate H_2O_2 in the reaction:



The simultaneous immobilization of both GOx and the mediator ferrocene (Fc) has been achieved by Bean et al. (2005a) in matrixes of photocurable pHEMA and in a copolymer film based on pHEMA and methyl methacrylate (Bean et al., 2005b). Biosensors were fabricated by mixing HEMA, the initiator DMPP, Fc, MMA and GOx and depositing the mixture on a screen-printed carbon paste electrode. Subsequently, the mixture was exposed to UV radiation until a thin layer of film was formed, and the electrode was used for glucose determination at low potential (+0.35 V, Bean et al., 2005a; +0.25 V, Bean et al., 2005b). The biosensor stability was 90% of the maximum current response after 14 days of storage. The main advantage of this procedure for biosensor fabrication is that it can be performed without any prolonged chemical treatment and the polymer matrix may be used for incorporating other oxidoreductase enzymes and ferrocene derivatives.

Portaccio et al. (2002) proposed the fabrication of a glucose sensor by immobilizing GOx on a nylon membrane chemically grafted with GMA. The preparation of the catalytic membranes was carried out in two steps: grafting copolymerization and enzyme immobilization. To obtain the nylon-poly(GMA) membranes, grafting copolymerization was carried out within the untreated nylon membranes, which were immersed in a reaction vessel filled with a water/ethanol solution containing GMA, $K_2S_2O_8$ and $Na_2S_2O_3$. At the end of the grafting process, the membranes were treated with dimethyl ketone, to remove the produced homopolymer, and dried until constant weight was reached. Enzyme immobilization was carried out using three successive treatments: first, the spacer hexamethylenediamine (HMDA) was attached to the grafted support; subsequently, the membrane was activated by the interaction which glutaraldehyde; and finally, the enzyme was immobilized on the activated support through covalent attachment to the glutaraldehyde. The preparation of the GMA membrane is illustrated in Fig. 1.

The biosensor fabricated with the GMA membrane exhibited a linear response range from 0.25 to 5.5 mM glucose; with a sensitivity of 3.05 $\mu A/mM$ and a response time of 33 s. The same authors also probed the immobilization of GOx on a nylon membrane chemically grafted with BMA. This membrane exhibited a linear response range from 0.1 to 20 mM glucose; a sensitivity of 0.87 $\mu A/mM$ and a response time of 68 s. Membranes grafted with BMA might be useful for determining large glucose concentration (up to 20 mM) even though the sensitivity is low and the response time is high. On the contrary, membranes grafted with GMA could be employed for detecting small glucose concentrations (up to 5 μM) with high sensitivity and fast response time. These results indicate that the diffusive

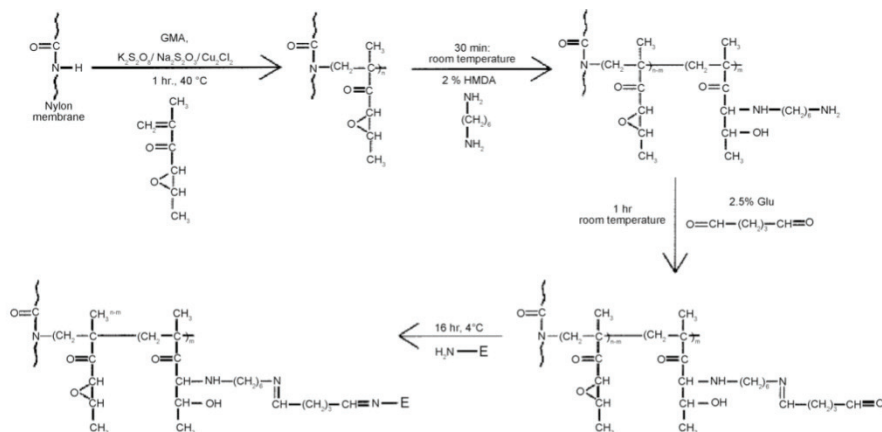


Fig. 1. Representation of the process of grafting, membrane activation and enzyme immobilization to obtain the GMA membrane. "Reprinted Portaccio et al. (2002), with permission from Elsevier."

transport of substrates and reaction products across a catalytic membrane of fixed pore size can be modulated by grafting monomers with different hydrophobic degree.

3.2. Amperometric biosensors based on cholinesterases

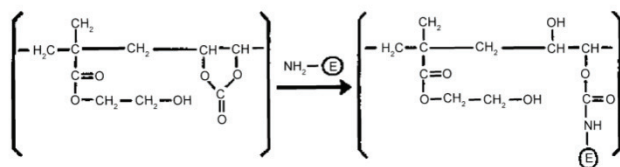
The detection of pesticides, carbamates and organophosphates is object of intensive research due to the importance of controlling toxic substances not only in food samples but also in the environment. Most pesticides act as inhibitors of cholinesterase enzymatic action and this principle is applied to fabricate enzyme electrodes for pesticide determination. The immobilization of acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7), butylcholinesterase (BChE; EC 3.1.1.8), and choline oxidase (ChOx; EC 1.1.3.17) is essential when designing these biosensors.

Doretto et al. (1999) have focused their work on the covalent co-immobilization of ChOx and BChE in a HEMA-vinylene carbonate (VCA) copolymer obtained by γ -radiation-induced polymerization, studying the influence of the enzyme concentration, ionic strength, VCA percentage in the copolymer, and activity ratio of the enzymes. An aqueous solution of HEMA and VCA was exposed to γ -radiation and cross-linked with methylolpropane trimethacrylate forming a sponge-like

material, which was sliced to obtain a membrane (see Scheme 5). Enzyme immobilization was performed by dropping a buffered enzymatic solution, first on one side of the membrane and, then, on the other side. The system was incubated overnight with the aim of blocking the unreacted carbonate groups until membrane formation.

The membrane was placed on the platinum electrode surface as is illustrated in Fig. 2. The amperometric transducer consisted of a platinum wire sealed in a glass tube. The biosensor was used in a batch system and the determination of acylcholine derivatives (acetylthiocholine, butyrylcholine and butyrylthiocholine) was performed electrochemically at +0.6 V by measuring the H_2O_2 generated in the oxidation of choline produced by the hydrolysis of the substrate. The butyrylthiocholine sensor yielded a linear response range between 5 and 100 μ M, a detection limit of 2 μ M, and a response time smaller than 2 min. The sensors exhibited low detection limits, fast response, wide pH and linear working ranges, and good stability, allowing the detection of pesticides and anti-cholinesterase agents by measuring the esterase inhibition due to these compounds.

Water-soluble polymer nanoparticles prepared using pBMA copolymerized with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) and *p*-nitrophenyloxycarbonyl polyethylene glycol



Scheme 5. Coupling reaction of cholinesterase with HEMA-VCA copolymer. "Reprinted Doretto et al. (1999), with permission from Portland Press."

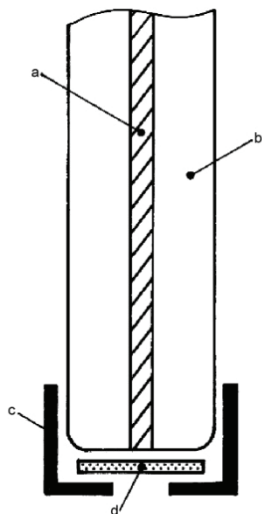


Fig. 2. Schematic diagram of sensor: a, platinum wire; b, glass; c, Teflon cap; d, PVA membrane. "Reprinted Doretto et al. (1999), with permission from Portland Press."

methacrylate (PMBN) were reported by Konno et al. (2004). The structure of the polymer, prepared by radical polymerization initiated with AIBN, is shown in Fig. 3.

AChE and ChOx were co-immobilized (dual-mode conjugation) on the surface of the nanoparticles and the enzymatic reactions continuously produced on the surface of the polymer nanoparticles were monitored using an amperometric microdialysis biosensor system with a platinum electrode for the determination of choline. The choline produced is reduced in the presence of the enzyme ChOx and the H_2O_2 generated is measured electrochemically at +550 mV. Increasing the local concentration of the enzymes allows to detect target molecules in situ.

Kok et al. (2001) developed an acetylcholinesterase–choline oxidase biosensor based on the property of carbamate and organophosphorous pesticides to inhibit the hydrolysis of acetylcholine to choline by AChE. In presence of carbamate the rate of choline production is reduced and the H_2O_2 concentration decreases. The pHEMA membranes were prepared by mixing HEMA with a $SnCl_4$ solution and polymerization was

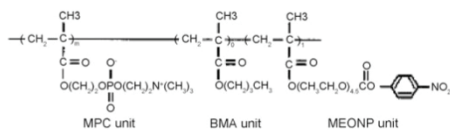


Fig. 3. Chemical structure of PMBN. "Reprinted Konno et al. (2004), with permission from American Chemical Society."

carried out by addition of AIBN as initiator and ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) as cross-linker, under UV irradiation in nitrogen atmosphere. The enzyme immobilization was carried out using two different methods: (i) enzyme entrapment by adsorption from an enzymatic solution placed on the membrane surface, subsequent membrane coverage with a solution of HEMA, AIBN and EGDMA, followed by polymerization to sandwich the adsorbed enzymes with a thin polymer film. (ii) A hybrid immobilization method involving both ionic (using Cibacron Blue F36A) and covalent bonding (via epichlorohydrin linkage). The membranes were first activated with Cibacron Blue F36A (CB) followed by activation with epichlorohydrin (Epi). The AChE and ChOx immobilization was achieved by putting in contact the activated membranes with a solution containing the enzymes. Both immobilization methods were employed to fabricate a biosensor for aldicarb (AS) determination using acetylcholine as substrate (Kok et al., 2002). Immobilized enzymes by entrapment were better protected and the biosensor showed longer lifetime, while CB–Epi immobilized bi-enzyme system gave lower detection limit (11.7 ppb versus 22.7 ppb).

The same authors (Kok and Hasirci, 2004) reported ionic-covalent enzyme immobilization for detection the anti-cholinesterase activity of aldicarb (AS), carbofuran (CF), carbaryl (CL), mixtures of AS and CF, and mixtures of AS plus CL, using acetylcholine as substrate. The detection limit obtained was 11.7 ppb for AS, 0.4 ppb for CF and 1.9 ppb for CL. The total anti-cholinesterase activity of binary pesticide mixtures was found to be lower than the sum of the individual inhibition values. These systems have potential to replace chromatographic methods in identification of contaminants.

3.3. Amperometric biosensors based on other enzymes

Ng et al. (2001) reported the covalent immobilization of sulphite oxidase (SOx; EC 1.8.3.1) onto a chitosan–p(HEMA) matrix (a natural–synthetic polymer hybrid), and the fabrication of a biosensor for determination of sulphite ions, that shows good reproducibility and repeatability. The polymer matrix was prepared by dissolving chitosan, HEMA and the photoinitiator 4-(benzoyl-benzyl)-trimethylammonium chloride (BTC) in acetic acid, followed by polymerization (under a mercury lamp) of the mixture previously deposited on a platinum disc electrode. Before enzyme immobilization the polymeric membrane was activated with *p*-benzoquinone, which facilitates the activation of the copolymer and also mediates the electron shuttling in the systems. Grafting poly(HEMA) with an elastic polymeric support, such as chitosan, increases the usefulness of the hydrogel by combining the mechanical strength of one component with the biocompatibility of the other. Furthermore, it was found that SOx retains its bioactivity when is covalently bonded on the chitosan–pHEMA matrix.

A glucose biosensor made of graphite powder and poly(methacrylate) incorporating glucose dehydrogenase (GDH; EC 1.1.99.17) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺) coenzyme was developed by Morales et al. (2000). The

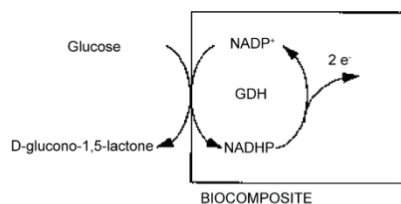
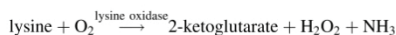


Fig. 4. Overall process of an amperometric glucose biosensor based on a GDH-NADP⁺-graphite-methacrylate biocomposite. "Reprinted Morales et al. (2000), with permission from Elsevier."

bulk immobilization of the enzyme and the cofactor was achieved by means of dry-chemistry procedures. Fig. 4 shows the scheme of an amperometric glucose biosensor based on a GDH-NADP⁺-graphite-methacrylate biocomposite.

The GDH-NADP⁺-graphite-methacrylate biosensor was used for glucose determination presenting the following characteristics: the linear range covers from 10 to 330 mM, the sensitivity was 0.5 nA mM⁻¹, and the detection limit was 3 mM. The biosensor response time was 2.5 min for 95% response with glucose concentration varying from 0 to 25 mM. Furthermore, the biocomposite was adequate to preserve the biological material, and easy to prepare.

Saurina et al. (1999) developed an amperometric lysine biosensor based on lysine oxidase (EC 1.4.3.14) immobilized within rigid conducting composites. This enzyme catalyses the oxidation of lysine according to the following scheme:



A graphite-methacrylate composite was prepared in airless environment by mixing the methacrylate monomer, the initiator benzoyl peroxide, and graphite powder. To prepare the biosensor, lysine oxidase membranes were chemically attached to the surface of rigid conducting composites. The enzyme immobilization was carried out by *o*-alkylation of the membrane with dimethyl sulphate followed by treatment with lysine as spacer arm and subsequent functionalization with glutaraldehyde. Lysine biosensors were constructed in three different configurations: (A) the lysine oxidase membrane was attached to a graphite-methacrylate composite electrode for the oxidative electrochemical detection of hydrogen peroxide at +1000 mV; (B) the lysine oxidase membrane was attached to a peroxidase-modified graphite-methacrylate biocomposite electrode for reductive electrochemical detection of oxidised peroxidase; (C) the lysine oxidase membrane was attached to a peroxidase-modified graphite-methacrylate biocomposite electrode which was used for hydroquinone-mediated detection. The sensitivity was higher in the (A) and (C) configurations although they were affected by other amino acids acting as interferents. These types of biosensors permit rapid analysis of lysine in contrast to time consuming chromatographic techniques. A scheme of the lysine biosensor is shown in Fig. 5. Figures of merit of these biosensors are given in Table 1.

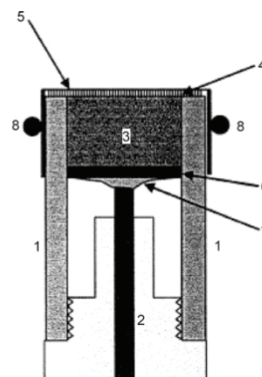


Fig. 5. Scheme of the lysine biosensor. 1, PVC electrode body; 2, connector piece; 3, conducting composite (or biocomposite); 4, lysine oxidase membrane; 5, dialysis membrane; 6, circular copper piece; 7, solder; 8, O-ring. "Reprinted Saurina et al. (1999), with permission from Elsevier."

3.4. Amperometric biosensors based on conducting and redox polymers

Conductive polymers have been extensively employed in the construction of biosensors because these materials facilitate the electron transfer between the enzyme active site and the electrode surface. Enzymes entrapped within polypyrrole (PPy) films prepared by electropolymerization from aqueous solutions have been commonly used to prepare electrodes. Thus, Brahim et al. (2002a) developed a glucose biosensor based on GOx entrapment within a composite pHEMA/PPy membrane. A mixture of HEMA, tetraethyleneglycol diacrylate (TEGDA) as cross-linker and enzyme was deposited on the platinum electrode surface and the polymerization of HEMA was performed by irradiating with UV light under argon atmosphere. Subsequently, the pyrrole monomer entrapped within the hydrogel network was electrochemical polymerized. An schematic view of the partial structure of the p(HEMA)/PPy/GOx polymer network is shown in Fig. 6.

Table 1
Figures of merit of the three lysine biosensors

Parameter	System A	System B	System C
Working potential (mV)	+1000	-150	-100
Linear range ^a (M)	Up to 1.2 × 10 ⁻⁴	Up to 4 × 10 ⁻⁵	Up to 1.6 × 10 ⁻⁴
Sensitivity (mA/M)	9850	440	11300
Repeatability (%)	1.4	4.5	1.8
Detection limit (M)	2.2 × 10 ⁻⁶	1.7 × 10 ⁻⁶	8.2 × 10 ⁻⁷
<i>t</i> ₉₅ (s)	38	30	42

Reprinted Saurina et al. (1999), with permission from Elsevier.

^a Linear range, sensitivity, repeatability, detection limit and *t*₉₅ were established by using a lysine oxidase membrane recently prepared. When enzymatic membrane ages these values become worse.

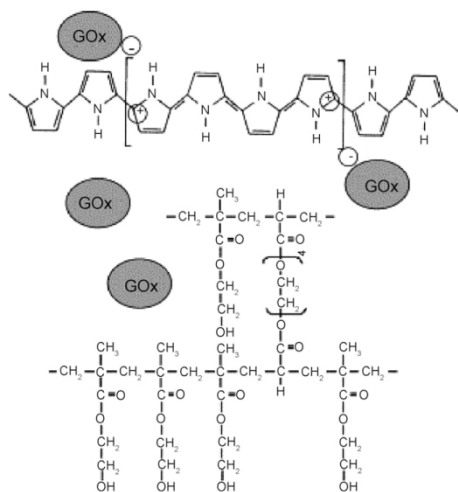


Fig. 6. Partial structure of the pHEMA/polypyrrole/GOx polymer network. "Reprinted Brahim et al. (2002a,b,c,d), with permission from Elsevier."

The optimized biosensor displayed a wide linear response range to glucose (between 5.0×10^{-5} and 2.0×10^{-2} M), a detection limit of 25 μ M, response time of 35–40 s, the stability was 3 weeks, and the analytical recovery of glucose in serum samples ranged from 98 to 102%. The same authors (Brahim et al., 2001) reported the development of an amperometric biosensor for cholesterol analysis prepared by entrapping cholesterol oxidase (ChOx; EC 1.1.3.6) onto the pHEMA/PPy

matrix. This biosensor displays a response time of 30 s, linear range from 5.0×10^{-4} to 1.5×10^{-2} M, detection limit of 120 μ M, stability of 360 days, and the recovery in serum ranged from 97 to 105%.

The pHEMA/PPy composite was also used by Brahim et al. (2002b) to immobilize galactose oxidase (GIOx; EC 1.1.3.9). The optimized biosensor displayed a linear range from 5.0×10^{-5} to 1.0×10^{-2} M galactose, a detection limit of 25 μ M, a response time of 70 s, good recovery of galactose in serum (97–105%) and a shelf-life higher than 9 months. In additional work concerning the fabrication of glucose, cholesterol and galactose biosensors (Brahim et al., 2002c) the above authors demonstrated that replacing pyrrole (Py) by dimethylaminoethyl methacrylate (DMA) and propylmethacrylate (PMA) the biosensing capability of the films was enhanced. The biosensors proposed showed an extensive linear response range (10^{-5} to 10^{-2} M), rapid response times (<60 s), storage stabilities up to 1 year and an excellent screening of physiological interferents such as ascorbic acid, uric acid and acetaminophen. The resulting polymer proved its potential to control the delivery of insulin and to function as a chemically synthesized artificial pancreas.

4. Optical biosensors

Nowadays, biosensors with optical transducers are receiving considerable attention due to the great development of optical fibers and laser technology. These sensors have extended the limit of application of the spectrophotometric methods in analytical chemistry particularly for miniaturized systems. The biosensors are based on the change of optical properties (UV–vis absorption, bio/chemiluminescence, fluorescence, reflectance, refractive index, etc.) caused by the interaction of the biocatalyst

Table 2
Different methacrylate as part of a biosensor

Methacrylate	Methacrylate preparation	Enzyme	Immobilization	Reference
pHEMA	UV radiation	GOx + Fc	Entrapment	Bean et al. (2005a)
HEMA–MMA	UV radiation	GOx + Fc	Entrapment	Bean et al. (2005b)
Nylon–poly(GMA)–HMDA–GA	Grafting copolymerization	GOx	Covalent	Portaccio et al. (2002)
Nylon–poly(BMA)–HMDA–GA	Grafting copolymerization	GOx	Covalent	Portaccio et al. (2002)
HEMA–VCA	γ -Radiation	ChOx + BChE	Covalent	Doretto et al. (1999)
MPC/Bu methacrylate/p-nitrophenylester bearing methacrylate	Radical copolymerization	AChE + ChOx	Conjugation	Konno et al. (2004)
pHEMA	UV radiation	AChE + ChOx	Entrapment or ionic-covalent hybridization	Kok et al. (2001)
pHEMA	UV radiation	AChE + ChOx	Entrapment or ionic-covalent hybridization	Kok et al. (2002)
pHEMA	UV radiation	AChE + ChOx	Entrapment or ionic-covalent hybridization	Kok and Hasirci (2004)
pHEMA–chitosan	UV curing	SOx	Covalent	Ng et al. (2001)
Graphite + p(methacrylate)	Curing	GDH + NADP ⁺	Bulk immobilization	Morales et al. (2000)
Graphite methacrylate biocomposite	Curing	Lysine oxidase	<i>o</i> -Alkylation	Saurina et al. (1999)
pHEMA–TEGDA	UV radiation	GOx	Entrapment	Brahim et al. (2002a)
pHEMA + PPy	UV radiation	CholOx	Entrapment	Brahim et al. (2001)
pHEMA + PPy	UV radiation	GIOx	Entrapment	Brahim et al. (2002b)
pHEMA–TEGDA + PPy	Electropolymerization	GOx	Entrapment	Brahim et al. (2002c)
PEGMA-co-TEGDMA	Emulsion photopolymerization	HRP	Covalent	Kim et al. (2005)

with the target analyte. Optical sensors based on pHEMA nanospheres containing biorecognition molecules have been prepared by Kim et al. (2005) for intracellular analysis. These sensors consist of an inert and biocompatible matrix in which a sensing material, an optical reporter, or both are entrapped. Horseradish peroxidase (HRP; EC 1.11.1.7) was encapsulated in nanospheres of poly(ethylene glycol) monomethacrylate-co-tetraethylene glycol dimethacrylate (PEGMA-co-TEGDMA) produced via reverse emulsion photopolymerization. Before polymerization, HRP was covalently coupled to the polymer backbone. The fluorescence emission response of the HRP-loaded hydrogel spheres changed as a function of H_2O_2 concentration in the presence of the reagent Amplex Red. The result suggests that the method of preparing hydrogel nanospheres containing active HRP may be extended to other enzymes and recognition molecules, and that the nanospheres could be used as optical nanosensors for intracellular analysis. Amperometric and optical enzyme electrodes based on methacrylate derivatives are summarized in Table 2.

5. Bioreactors based on methacrylate derivatives

A bioreactor is defined as a reactor in which a chemical conversion reaction is catalysed by an enzyme. Several authors have described bioreactors that employ methacrylate derivatives as enzyme immobilization support. Bayramoğlu et al. (2002) reported the immobilization of four enzymes in

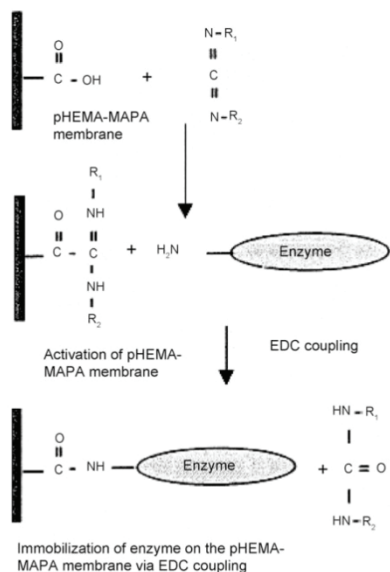


Fig. 7. Schematic representation of lipase immobilization on to pHEMA-MAPA membrane. "Reprinted Bayramoğlu et al. (2002), with permission from Elsevier."

methacrylate-based supports for its use in a reactor. A pHEMA matrix was prepared in membrane form by copolymerization of HEMA with the hydrophobic co-monomer (2-methacrylamidophenylalanine, MAPA) using AIBN as initiator. The pHEMA-MAPA membrane was activated with carbodiimide and subsequently employed to immobilize lipase (EC 3.1.1.3) via covalent attachment (see Fig. 7). The activity of the free and the immobilized enzyme was determined by means of olive oil hydrolysis which was carried out in a shaker water batch.

The same authors also reported the covalent immobilization of invertase (EC 3.2.1.26) on p(HEMA-GMA) films (Bayramoğlu et al., 2003). The films were prepared by UV-initiated photopolymerization of the mixture of HEMA and GMA with AIBN. The chemical structure of the films together with the immobilization reaction (via amino groups) is depicted in Fig. 8. Films with immobilized enzyme were used as enzyme reactors for the production of glucose and fructose from sucrose in a continuous system. The activity of the free and the immobilized invertase was determined by measuring the amount of glucose liberated from the invertase-catalysed hydrolysis of sucrose. Enzyme electrodes and reactors prepared with this immobilization system showed good mechanical stability.

Acrylic copolymers were synthesized in bead form from the monomers MMA, GMA using divinyl benzene (DVB) as cross-linker Arica et al. (2004) and tyrosinase (PPO; EC 1.14.18.1) was covalently immobilized within the p(MMA-GMA-divinyl benzene) microbeads. The chemical structure of p(GMA-MMA-DVB) copolymer is represented in Fig. 9. The system was employed to study the immobilized enzyme in continuous flow. Moreover, Bayramoğlu et al. (2005) reported the immobilization of urease (EC 3.5.1.5) via adsorption onto p(HEMA-co-N-methacryloyl-L-histidinemethyl ester) (pHEMA-MAH) and p(HEMA-MAH)-Ni (II) microspheres prepared via suspension

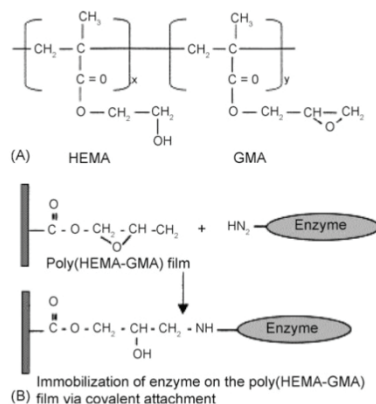


Fig. 8. Representative chemical structures: (A) chemical structure of poly(HEMA-GMA) film, (B) immobilization of enzyme via amino group onto epoxy film. "Reprinted Bayramoğlu et al. (2003), with permission from Elsevier."

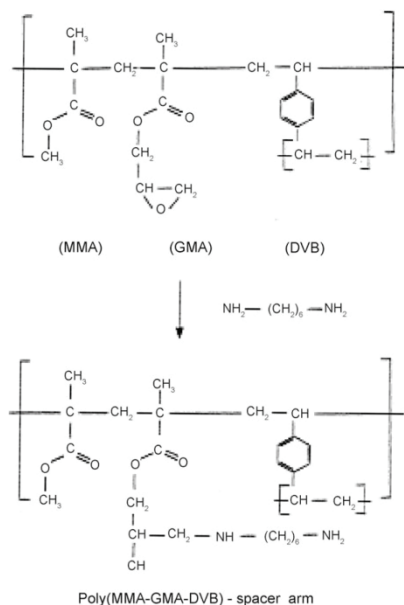


Fig. 9. Chemical structure of poly(GMA-MMA-DVB) microbead. "Reprinted Arica et al. (2004), with permission from Elsevier."

polymerization. The immobilized urease was used for studying the degradation of urea in a packed-bed enzyme reactor. The microspheres were used several times without loss of the adsorption capacity, which is of interest for biotechnological (removal of urea from biological fluids) and biomedical application in artificial kidney devices.

Brahim et al. (2002d) immobilized GOx onto p(2-hydroxyethyl methacrylate-co-dimethylaminoethyl methacrylate) (pHEMA-DMAEMA) hydrogel microspheres prepared by inverse suspension polymerization method. The discontinuous phase consisted of volumes of HEMA, DMAEMA and TEGDA dissolved in buffer and the continuous phase was composed of sorbitan sesquioleate dissolved in paraffin oil. Both phases were purged with nitrogen for 30 min and the polymerization was initiated by TEMED. The produced hydrogel microspheres

were centrifuged, washed, and finally packed into a plug-flow bioreactor with the aim to determine glucose in human serum. All these bioreactors based on methacrylate derivatives are summarized in Table 3.

6. Enzyme immobilization system based on methacrylate derivatives

Enzyme immobilization based on methacrylate derivatives for designing enzyme electrodes have been reported by Schulz et al. (1999) that investigated the immobilization of GOx using p(HEMA). Mixtures of HEMA containing AIBN and buffer solutions of GOx were polymerized by UV radiation. They differentiate between the influence of the reagents (monomer concentration, solvent) in the polymerization, and the processing conditions such as ultraviolet radiation intensity, temperature and concentration of radicals generated from the initiator. The entrapment of GOx in pHEMA provides long enzyme stability, which can then be used to fabricate stable biosensors for application *in vivo*.

Traitel et al. (2000) have studied a glucose-responsive insulin controlled release system based on the hydrogel p(HEMA-co-DMAEMA) with entrapped GOx, catalase (EC 1.11.1.6) and insulin. The hydrogel matrices were prepared by mixing monomers, tetraethyleneglycol dimethacrylate (TEGDMA) as cross-linker, distilled water and ethyleneglycol to obtain a homogeneous solution where the initiators were added and the polymerization was carried out at room temperature. When exposed to physiological fluids, glucose diffuses into the hydrogel, glucose oxidase catalyzes the glucose conversion to glucuronic acid causing the swelling of the pH-sensitive hydrogel and the subsequent release of insulin. The higher the glucose concentration in the medium, the higher and faster the swelling and release rate. The study describes the swelling and release kinetics of the hydrogel and its dependence on oxygen availability and polymer morphology demonstrating that cross-linked hydrogels are effective in reducing blood glucose levels when used as insulin release systems.

The epoxide groups of grafted pGMA brushes were utilized by Xu et al. (2005), for direct coupling of GOx. Well-defined pGMA brushes covalently tethered on silicon surfaces [Si-g-p(GMA) hybrids] were prepared, via surface-initiated atom-transfer radical polymerization (ATRP), on the 4-vinylbenzyl chloride (VGC)-coupled silicon surface. A schematic diagram of the polymerization process is depicted in Fig. 10. The activity of the immobilized GOx was measured on a biochemistry analyzer and it was found that the brushes

Table 3
Bioreactors based on methacrylate derivatives

Methacrylate	Methacrylate preparation	Enzyme	Immobilization	Reference
pHEMA-MAPA	UV radiation	Lipase	Covalent	Bayramoğlu et al. (2002)
pHEMA-GMA	UV radiation	Invertase	Covalent	Bayramoğlu et al. (2002)
pMMA-GMA-DVB	UV radiation	Tyrosinase	Covalent	Bayramoğlu et al. (2004)
pHEMA-MAH	UV radiation	Urease	Adsorption	Bayramoğlu et al. (2005)
pHEMA-DMEMA	Inverse suspension polymerization	GOx	Entrapment or covalent	Brahim et al. (2002d)

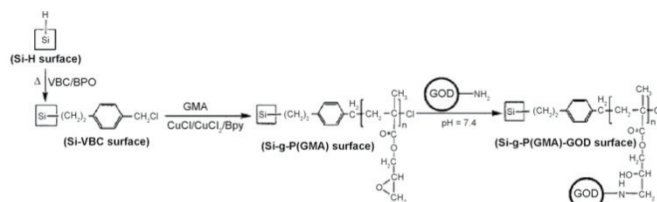


Fig. 10. Schematic diagram illustrating the processes: (i) radical-initiated hydrosilylation of VBC with the Si-H surface to give the Si-VBC surface, (ii) surface-initiated atom-transfer radical polymerization of GMA on the Si-VBC surface at room temperature, and (iii) GOD immobilization on the Si-g-P(GMA) surface. "Reprinted Xu et al. (2005), with permission from American Chemical Society."

improve the stability of the enzyme during storage as compared with the free enzyme.

Podual et al. (2000a) have developed glucose-sensitive hydrogels prepared by copolymerization of diethylaminoethyl methacrylate (DEAEM), polyethylene glycol monomethacrylate (PEGMA), GOx and catalase in solution and they investigated their dynamic response. The copolymerization was carried out by mixing the two monomers (see Fig. 11), the cross-linker (TEGDMA) and the enzyme solution under nitrogen atmosphere at room temperature. The aqueous monomer mixture was then photopolymerized to obtain films. The same authors also studied the equilibrium and dynamic swelling of the hydrogels as a function of pH (Podual et al., 2000b). They found that hydrogels have complex non-linear swelling and deswelling and in some cases show pulsated swelling. The latter properties are of great interest for applications in stimulus-sensitive release of insulin.

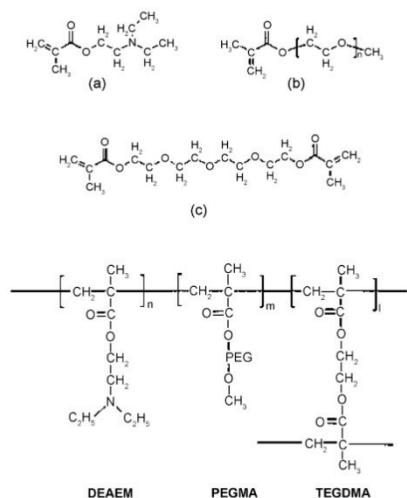


Fig. 11. Co-monomers and cross-linking agents used in the formation of the P(DEAEM-g-EG) hydrogels. (a) DEAEM; (b) PEGMA; (c) TEGDMA. "Reprinted Podual et al. (2000a,b,c), with permission from Elsevier."

GOx and catalase were immobilized on *p*-diethylaminoethyl methacrylate-*co*-ethylene glycol p(DEAEM-*co*-EG) gel copolymers (Podual et al., 2000c). The immobilization was carried out mixing the two monomers (see Fig. 11), TEGDMA, and the enzyme and the solution was photopolymerized to obtain films or disks. Microparticles were prepared by dispersing the aqueous monomer mixture in nitrogen-purge silicone oil. The redox initiators, sodium methabisulphite and ammonium persulphate were dissolved in water and added to the dispersion. It was found that catalase increases the rate of swelling of the gel, and higher enzyme loading resulted in faster initial rate of reaction but in a lower final conversion. The gels demonstrated a reversible swelling in response to pulsatile variations in glucose. The same authors (Podual et al., 2004) investigated the dynamic and pulsatile swelling properties of GOx-immobilized onto hydrogel microspheres and the dynamic swelling response to pH. The gel response-speed increases as the particle size decreases, and the cross-linking content influences not only the extent of swelling but also the speed of the network response. A comprehensive experimental model for the swelling and release behaviour of the systems based on p(DEAEM-*co*-EG) hydrogels is presented. Furthermore, a theoretical swelling model was set up to predict insulin release from the hydrogel microspheres. This is the first time that a glucose-responsive hydrogel has been modelled with respect to its swelling and release behaviour.

Tzoris et al. (2003) have illustrated a polymyxin B (PMB) modified copolymer of ethyl acrylate and pHEMA. The copolymer was designed for biosensor interfaces to provide protection against microbial contamination. The copolymer prepared by solution polymerization was deposited on an ion-sensitive field-effect transistor (ISFET). The ion-step ISFET technique was adopted as a novel method to study the PMB immobilization and leaching.

Di Nino et al. (2004) reported the anchoring of lactoperoxidase (LPO; EC 1.11.1.7) onto a macroporous hydroxylic resin formed by copolymerization of HEMA and GMA and the stabilization of the enzyme maintaining its catalytic activity. The mixture of GMA, HEMA and water was polymerized upon γ -ray exposure. LPO was linked to the resin using the reactivity of the epoxy groups of GMA monomers and the accessible nucleophilic groups of the

Table 4
Enzyme immobilization system based on methacrylates derivatives

Methacrylate	Methacrylate preparation	Enzyme	Immobilization	Reference
pHEMA	UV radiation	GOx	Entrapment	Schulz et al. (1999)
p(HEMA-co-DMAEMA)	Homogenous solution	GOx + catalase + insulin	Entrapment	Traitel et al. (2000)
pGMA-Si(III) hybrids	Radical-initiated hydrosilylation	GOx	Covalent	Xu et al. (2005)
DEAEM-PEGMA-TEGDMA	Suspension polymerization	GOx + catalase	Entrapment	Podual et al. (2000a)
p(DMAEM-g-EG)	Suspension polymerization	GOx + catalase	Entrapment	Podual et al. (2000b)
p(DMAEM-g-EG)	Suspension polymerization	GOx + catalase	Entrapment	Podual et al. (2000c)
p(DEAEM-g-EG)	Suspension polymerization	GOx + catalase	Entrapment	Podual et al. (2004)
pHEMA-Et-acrylate	UV radiation	Polymixin B	Grafting	Tzoris et al. (2003)
pHEMA-GMA	UV radiation	Lactoperoxidase	Chemical linkage	Di Nino et al. (2004)
pGMA-GDMA	Microemulsion	Trypsin	Covalent	Malmsten and Larsson (2000)
pHEMA	Sol-gel film	Hexokinase	Entrapment	Hussain et al. (2005)

enzyme. The determination of LPO was carried out with the atom-transfer radical polymerization (ABTS-assay) following the absorbance of the oxidised ABTS. The γ -ray synthesised functional resin p(HEMA-GMA) appears to be an effective resin able to anchor LPO and to preserve its catalytic activity. Dispersing LPO onto amphiphilic resin can regulate the molar fraction of water put in contact with LPO in each individual resin particle.

The immobilization of trypsin (EC 3.4.21.4) in porous cross-linked *p*-glycidyl methacrylate-glycidyl methacrylate-co-1,3-dimethacrylate (pGMA-GDMA) beads was investigated by Malmsten and Larsson (2000). In particular, they reported the effects of the surface modification of the beads (through hydrophilic polymers) on the amount of protein immobilized and on the extent of retained enzymatic activity. Furthermore, the immobilization within unmodified and hydrophilized beads prepared from aqueous solutions was compared with beads synthesized from a water-in-oil microemulsion. It was found that the amount of trypsin immobilized within the unmodified GMA-GDMA beads was higher in the hydrophilized GMA-GDMA beads. However, the specific-enzymatic activity loss after immobilization was larger for the unmodified beads than for the hydrophilized ones.

Hussain et al. (2005) reported a decrease in the intrinsic fluorescence of yeast hexokinase (EC 2.7.1.1) entrapped in a silica sol-gel matrix when glucose is added. The sol-gel films containing entrapped hexokinase were covered with a biocompatible pHEMA membrane for *in vivo* application, and glucose was monitored by the decrease of the intrinsic fluorescence of hexokinase. This system could be considered as a first stage in the development of *in vivo* glucose sensor (for example, the entrapped hexokinase could be placed at the tip of a fiber-optic probe implanted in a subcutaneous tissue). All these enzyme immobilization systems based on methacrylate derivatives are summarized in Table 4.

Acknowledgement

The authors acknowledge financial support from DGI (MAT2003-03051-C03-03) of the Spanish Science and Technology Ministry.

References

- Arica, M.Y., Bayramoğlu, G., Biçak, N., 2004. Characterisation of tyrosinase immobilised onto spacer-arm attached glycidyl methacrylate-based reactive microbeads. *Process Biochem.* 39, 2007–2017.
- Arica, Y.M., Alaeddinoglu, N.G., Hasirci, V., 1998. Immobilization of glucoamylase onto activated pHEMA/EGDMA microspheres: properties and application to a packed-bed reactor. *Enzyme Microb. Technol.* 22, 152–157.
- Arica, Y.M., Hasirci, V., 1987. Immobilization of glucose oxidase on pHEMA membranes. *Biomaterials* 8, 489–495.
- Bayramoğlu, G., Akgöl, S., Bulut, A., Denizli, A., Arica, M.Y., 2003. Covalent immobilisation of invertase onto a reactive film composed of 2-hydroxyethyl methacrylate and glycidyl methacrylate: properties and application in a continuous flow system. *Biochem. Eng. J.* 14, 117–126.
- Bayramoğlu, G., Kaçar, Y., Denizli, A., Arica, M.Y., 2002. Covalent immobilization of lipase onto hydrophobic group incorporated poly(2-hydroxyethyl methacrylate) based hydrophilic membrane matrix. *J. Food Eng.* 52, 367–374.
- Bayramoğlu, G., Yalçın, E., Arica, M.Y., 2005. Immobilization of urease via adsorption onto L-histidine-Ni(II) complexed poly(HEMA-MAH) microspheres: preparation and characterization. *Process Biochem.* 40, 3505–3513.
- Béal, L., Chevalier, Y., 2005. Adsorption of block copolymers at latex surface and their utilization in emulsion polymerization. *Polymer* 46 (4), 1395–1405.
- Bean, L.S., Heng, L.Y., Yamin, B.M., Ahmad, M., 2005a. Photocurable ferrocene-containing poly(2-hydroxyl ethyl methacrylate) films for mediated amperometric glucose biosensor. *Thin Solid Films* 477, 104–110.
- Bean, L.S., Heng, L.Y., Yamin, B.M., Ahmad, M., 2005b. The electrochemical behaviour of ferrocene in a photocurable poly(methyl methacrylate-co-2-hydroxyethyl methacrylate) film for a glucose biosensor. *Bioelectrochemistry* 65, 157–162.
- Blandino, A., Macias, M., Cantero, D., 2001. Immobilization of glucose oxidase within calcium alginate gel capsules. *Process Biochem.* 36, 601–606.
- Braden, M., Clarke, R.L., Nicholson, J., Parker, S., 1997. *Polymeric Dental Materials*. Springer, Berlin, pp. 101–103.
- Brahim, S., Maharaj, D., Narinesingh, D., Guiseppi-Elie, A., 2002b. Design and characterization of a galactose biosensor using a novel polypyrrole-hydrogel composite membrane. *Anal. Lett.* 35 (5), 797–812.
- Brahim, S., Narinesingh, D., Guiseppi-Elie, A., 2002c. Bio-smart hydrogels: co-joined molecular recognition and signal transduction in biosensor fabrication and drug delivery. *Biosens. Bioelectron.* 17, 973–981.
- Brahim, S., Narinesingh, D., Guiseppi-Elie, A., 2002d. Kinetics of glucose oxidase immobilized in p(HEMA)-hydrogel microspheres in a packed-bed bioreactor. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 18, 69–80.
- Brahim, S., Narinesingh, D., Guiseppi-Elie, A., 2001. Amperometric determination of cholesterol in serum using a biosensor of cholesterol oxidase contained within a polypyrrole-hydrogel membrane. *Anal. Chim. Acta* 448, 27–36.

- Brahim, S., Narinesingh, D., Guiseppi-Elie, A., 2002a. Polypyrrole-hydrogel composites for the construction of clinically important biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 17, 53–59.
- Calvo, E.J., Ethenique, R., Pietrasanta, L., Wolosiuk, A., Danilowicz, C., 2001. Layer-by-layer self-assembly of glucose oxidase and Os(Bpy)₂Cl-PyCH₂NH-poly(allylamine) bioelectrode. *Anal. Chem.* 73 (6), 1161–1168.
- Cen, L., Neoh, K.G., Kang, E.T., 2003. Surface functionalization of polypyrrole film with glucose oxidase and viologen. *Biosens. Bioelectron.* 18 (4), 363–374.
- Chatzandroulis, S., Goustouridis, D., Raptis, I., 2005. Polymeric film characterization for use in bimorph chemical sensors. *Microelectron. Eng.* 78–79, 118–124.
- Chatzandroulis, S., Tegou, E., Goustouridis, D., Polymenakos, S., Tsoukalas, D., 2004a. Capacitive-type chemical sensors using thin silicon/polymer bimorph membranes. *Sens. Actuators B: Chem.* 103 (1–2), 392–396.
- Chatzandroulis, S., Tegou, E., Goustouridis, D., Polymenakos, S., Tsoukalas, D., 2004b. Fabrication of chemical sensors based on Si/polymer bimorphs. *Microelectron. Eng.* 73–74, 847–851.
- Chen, C.H., Lee, W.C., 1999. Preparation of methyl methacrylate and glycidyl methacrylate copolymerized nonporous particles. *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* 37 (10), 1457–1463.
- Chinnayekka, S., McShane, M.J., 2004. RET nanobiosensors based on affinity binding between apo-enzyme and its substrate. *Biomacromolecules* 5, 1657–1661.
- Craig, R.G., 1991. Denture materials and acrylic base materials. *Curr. Opin. Dent.* 1, 235–243.
- Di Nino, G., Turacchio, M., D'Archivio, A.A., Lora, S., Corain, B., Antonini, G., 2004. Catalytic activity of bovine lactoperoxidase supported on macroporous poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate). *React. Funct. Polym.* 61, 411–419.
- Doretto, L., Ferrara, D., Lora, S., Palma, G., 1999. Amperometric biosensor involving covalent immobilization of choline oxidase and butyrylcholinesterase on a methacrylate-vinylene carbonate co-polymer. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29, 67–72.
- Doretto, L., Gattolin, P., Lora, S., 1994. Amperometric choline sensor with enzyme immobilized by gamma-irradiation in a biocompatible membrane. *Anal. Lett.* 27 (13), 2455–2470.
- Douglas, W.H., Bates, J.F., 1978. The determination of residual monomer in polymethyl methacrylate denture base resins. *J. Mater. Sci.* 13, 2600–2604.
- Ferriol, M., Gentilhomme, A., Cochez, M., Oget, N., Mieloszynski, J.L., 2003. Thermal degradation of poly(methyl methacrylate) (PMMA): modelling of DTG and TG curves. *Polym. Degrad. Stab.* 79 (2), 271–281.
- Hussain, F., Birch, D.J.S., Pickup, J.C., 2005. Glucose sensing based on the intrinsic fluorescence of sol-gel immobilized yeast hexokinase. *Anal. Biochem.* 339, 137–143.
- Jiu, H., Ding, J., Sun, Y., Bao, J., Gao, C., Zhang, Q., 2006. Fluorescence enhancement of europium complex co-doped with terbium complex in a poly(methyl methacrylate) matrix. *J. Non-Crystal. Sol.* 352 (3), 197–202.
- Kamakura, M., Fujimura, T., Kaetsu, I., 1983. Initial stage in radiation polymerization of hydroxyethyl methacrylate-water system at low temperatures. *Eur. Polym. J.* 19, 621–626.
- Kim, G.H., 2005. A PMMA composite as an optical diffuser in a liquid crystal display backlighting unit (BLU). *Eur. Polym. J.* 41 (8), 1729–1737.
- Kim, S.H., Kim, S., Yadavalli, V.K., Pishko, M.V., 2005. *Anal. Chem.* 77, 6828–6833.
- Klomp, G.F., Hashiguchi, H., Ursell, P.C., Takeda, Y., Taguchi, T., Dobelle, W.H., 1983. Macroporous hydrogel membranes for a hybrid artificial pancreas. Part II. Biocompatibility. *J. Biomed. Mater. Res.* 17, 865–871.
- Kok, F.N., Bozgu, F., Hasirci, V., 2001. Immobilization of acetylcholinesterase and choline oxidase in/on pHEMA membrane for biosensor construction. *J. Biomater. Sci.-Polym. Ed.* 12 (11), 1161–1176.
- Kok, F.N., Bozgu, F., Hasirci, V., 2002. Construction of an acetylcholinesterase-choline oxidase biosensor for aldicarb determination. *Biosens. Bioelectron.* 17, 531–539.
- Kok, F.N., Hasirci, V., 2004. Determination of binary pesticide mixtures by an acetylcholinesterase-choline oxidase biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 19, 661–665.
- Konno, T., Watanabe, J., Ishihara, K., 2004. Conjugation of enzymes on polymer nanoparticles covered with phosphorylcholine groups. *Biomacromolecules* 5 (2), 342–347.
- Lee, S.S., Park, K.Y., Kim, J.Y., Suh, K.D., 2001. Effect of GMA on mono-disperse epoxy-functionalized polymer microsphere particles by dispersion copolymerisation of styrene with glycidyl methacrylate. *J. Appl. Polym. Sci.* 80, 1206–1212.
- Liu, X., Neoh, K.G., Cen, L., Kang, E.T., 2004. Enzymatic activity of glucose oxidase covalently wired via viologen to electrically conductive polypyrrole films. *Biosens. Bioelectron.* 19 (8), 823–834.
- Malhotra, B.D., Chaubey, A., 2003. Biosensors for clinical diagnostics industry. *Sens. Actuators B* 91, 117–127.
- Malmsten, M., Larsson, A., 2000. Immobilization of trypsin on porous glycidyl methacrylate beads: effects of polymer hydrophilization. *Colloids Surf. B* 18, 277–284.
- Marquette, C.A., Blum, L.J., 2003. Self-containing reactant biochips for the electrochemiluminescent determination of glucose, lactate and choline. *Sens. Actuators B* 90 (3), 112–117.
- Martínez-Hernández, A.L., Velasco-Santos, C., Icaza, M., Castaño, V.M., 2005. Mechanical properties evaluation of new composites with protein biofibers reinforcing poly(methyl methacrylate). *Polymer* 46 (19), 8233–8238.
- Monthead, J.P., Chatzopoulos, M., Chappard, D., 1992. 2-Hidroxyethyl methacrylate (HEMA): chemical properties and applications in biomedical fields. *Rev. Macromol. Chem. Phys.* 32, 1–34.
- Morales, A., Céspedes, F., Alegret, S., 2000. Graphite-methacrylate biocomposite material with renewable sensing surface for reagentless amperometric biosensors based on glucose dehydrogenase. *Mater. Sci. Eng. C: Biomim.* 7, 99–104.
- Murray, M.D., Darvell, B.W., 1993. The evolution of the complete denture base. Theories of complete denture retention a review. Part I. *Aust. Dent. J.* 38, 216–219.
- Nam, K., Watanabe, J., Ishihara, K., 2004. The characteristics of spontaneously forming physically cross-linked hydrogels composed of two water-soluble phospholipid polymers for oral drug delivery carrier. Part I. Hydrogel dissolution and insulin release under neutral pH condition. *Eur. J. Pharm. Sci.* 23 (3), 261–270.
- Ng, L.T., Guthrie, J.T., Yuan, Y.J., Zhao, H., 2001. UV-cured natural polymer-based membrane for biosensor application. *J. Appl. Polym. Sci.* 79 (3), 466–472.
- Oliveira-Cardoso, A., Galembeck, F., 1998. Polymer latex stability modification by exposure to hydrophobic solvents. *J. Colloid Interf. Sci.* 204 (1), 16–23.
- Parker, S., Martin, D., Braden, M., 1998. Soft acrylic resin materials containing a polymerisable plasticiser. Part I. Mechanical properties. *Biomaterials* 19 (18), 1695–1701.
- Podual, K., Doyle III, F., Peppas, N.A., 2000a. Preparation and dynamic response of cationic copolymer hydrogels containing glucose oxidase. *Polymer* 41, 3975–3983.
- Podual, K., Doyle III, F., Peppas, N.A., 2000b. Glucose-sensitivity of glucose oxidase-containing cationic copolymer hydrogels having poly(ethylene glycol) grafts. *J. Control Release* 67, 9–17.
- Podual, K., Doyle III, F., Peppas, N.A., 2000c. Dynamic behaviour of glucose oxidase-containing microparticles of poly(ethylene glycol)-grafted cationic hydrogels in an environment of changing pH. *Biomaterials* 21, 1439–1450.
- Podual, K., Doyle III, F., Peppas, N.A., 2004. Modeling of water transport in and release from glucose-sensitive swelling-controlled release systems based on poly(diethylaminoethyl methacrylate-g-ethylene glycol). *Ind. Eng. Chem. Res.* 43, 7500–7512.
- Portaccio, M., El-Masry, M., Diano, N.R., De Maio, A., Grano, V., Lepore, M., Travascio, P., Bencivenga, U., Pagliuca, N., Mita, D.G., 2002. An amperometric sensor employing glucose oxidase immobilized on nylon membranes with different pore diameter and grafted with different monomers. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 18, 49–67.
- Ratner, B.D., Hoffman, A.S., 1976. Synthetic hydrogels for biomedical applications. In: Andrade, J.D. (Ed.), *Hydrogels for Medical and Related Application*. American Chemical Society, Washington, DC.
- Safa, K.D., Nasirabrizi, M.H., 2005. One-pot, novel chemical modification of glycidyl methacrylate copolymers with very bulky organosilicon side chain substituents. *Eur. Polym. J.* 41 (10), 2310–2319.

- Sarac, D., Sinasi Sarac, Y., Basoglu, T., Yapici, O., Yuzbasioglu, E., 2006. The evaluation of microleakage and bond strength of a silicone-based resilient liner following denture base surface pre-treatment. *J. Prosth. Dent.* 95 (2), 143–151.
- Saurina, J., Hernández-Cassou, S., Alegret, S., Fàbregas, E., 1999. Amperometric determination of lysine using a lysine oxidase biosensor based on rigid-conducting composites. *Biosens. Bioelectron.* 14, 211–220.
- Schulz, B., Riedel, A., Abel, P.U., 1999. Influence of polymerization parameters and entrapment in poly(hydroxyethyl methacrylate) on activity and stability of GOD. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 7, 85–91.
- Simms, J.A., 1961. Epoxide-substituted vinyl and acrylate copolymers. *J. Appl. Polym. Sci.* 5 (13), 58–63.
- Suzuki, H., Kumagai, A., Ogawa, K., Kokufuta, E., 2004. New type of glucose sensor based on enzymatic conversion of gel volume into liquid column length. *Biomacromolecules* 5 (2), 486–491.
- Traitel, T., Cohen, Y., Kost, J., 2000. Characterization of glucose-sensitive insulin release systems in simulated in vivo conditions. *Biomaterials* 21, 1679–1687.
- Tzoris, A., Hall, E.A.H., Besselink, G.A.J., Bergveld, P., 2003. Testing the durability of polymyxin B immobilization on a polymer showing antimicrobial activity: a novel approach with the ion-step method. *Anal. Lett.* 36 (9), 1781–1803.
- Wichterle, O., Lim, D., 1960. Hydrophilic Gels for Biologic Use. *Nature. N.Y.* St Martin's Press Inc., p. 117.
- Wright, P.S., 1981. Composition and properties of soft lining materials for acrylic dentures. *J. Dent.* 9, 210–223.
- Xu, F.J., Cai, Q.J., Li, Y.L., Kang, E.T., Neoh, K.G., 2005. Covalent immobilization of glucose oxidase on well-defined poly(glycidyl methacrylate)-Si(1 1 1) hybrids from surface-initiated atom-transfer radical polymerization. *Biomacromolecules* 6 (2), 1012–1020.
- Yang, W., Hu, J., Tao, Z., Li, L., Wang, C., Fu, S., 1999. Dispersion copolymerization of styrene and glycidyl methacrylate in polar solvents. *Colloid Polym. Sci.* 277 (5), 446–451.
- Yang, Y., Mu, S., Chen, H., 1998. Electrochemical synthesis of polypyrrole for the immobilization of galactose oxidase. *Synth. Metals* 92 (2), 173–178.
- Yoshida, M., Kaetsu, I., 1981. Immobilization of glucoamylase on polymer surface by radiation-induced polymerization of glass-forming monomers at low temperatures. *J. Appl. Polym. Sci.* 26, 687–700.
- Zdyrko, B., Swaminatha, K.I., Luzinov, I., 2006. Macromolecular anchoring layers for polymer grafting: comparative study. *Polymer* 47 (1), 272–279.

4.4. "Encapsulation of glucose oxidase within poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate microparticles for developing an amperometric glucose biosensor". Encapsulación de glucosa oxidasa en micropartículas de poli(etilenglicol) metil eter metacrilato para el desarrollo de un biosensor amperométrico de glucosa. *Talanta*, 75, 1151-1157 (2008)

Dentro de la búsqueda de una adecuada matriz de inmovilización en la fabricación de biosensores, se han diseñado micropartículas poliméricas de un polímero biocompatible, no citotóxico, mono-funcional y temperatura dependiente, lo que permite estudiar su comportamiento en sus fases hinchada y colapsada. Esta matriz esta formada por poli(etilenglicol) metil éter metacrilato.

La GOx pertenece al grupo de las oxidoreductasas y media en la oxidación de la glucosa gracias a la participación de una molécula de *FADH* de su centro activo en el proceso de oxidación. Este cofactor frecuente en gran cantidad de enzimas oxido reductoras actúa como intermediario en la oxidación de una molécula de glucosa cediendo posteriormente los electrones al O_2 y produciendo H_2O_2 . Esta enzima se ha caracterizado por su gran estabilidad tanto química como física, lo cual ha sido atribuido a la existencia de residuos de manosa en la periferia de la enzima que la estabilizan.

El objetivo del trabajo consistió en el diseño y desarrollo de un biosensor electroquímico como dispositivo analítico sensible a glucosa. En una primera parte del trabajo se prepararon y caracterizaron micropartículas biocompatibles de p-PEGMEM, estudiando los parámetros que afectan a esta etapa para lograr la máxima eficacia en el proceso de inmovilización enzimático. Las micropartículas con glucosa oxidasa fueron utilizadas como componente biológico de un sensor amperométrico de glucosa. La reticulación de cadenas poliméricas que presentan un balance adecuado entre grupos o segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos puede dar lugar a hidrogeles capaces de formar puentes de hidrógeno con el agua e hidratarse a

temperatura ambiente. Si la temperatura se eleva, los puentes de hidrógeno se debilitan, al tiempo que las interacciones hidrofóbicas se intensifican y la red polimérica se contrae. La temperatura crítica de transición entre el estado hinchado y el contraído disminuye a medida que aumenta la proporción de grupos hidrofóbicos y, por lo tanto, se puede modular modificando la estructura del hidrogel. Por debajo de la temperatura crítica, el hidrogel se encuentra en estado hinchado con lo que, si presenta un grado de reticulación adecuado, se facilitará la difusión a su través de moléculas de naturaleza muy diversa, incluyendo el sustrato glucosa, específico para la glucosa oxidasa. En cambio, si se supera la LCST, el gel se contrae progresivamente desde la superficie hacia el interior y se forma una capa externa de baja porosidad que dificulta la difusión del sustrato.

Se estudió la influencia de diversos parámetros en la respuesta del biosensor, tales como potencial de trabajo, pH del medio y fundamentalmente temperatura, considerando el carácter termodependiente del microgel utilizado, obteniéndose un dispositivo sensible y reproducible para la detección de glucosa con un límite de detección de 1 μM . La aplicabilidad del biosensor propuesto se demostró mediante su utilización en el análisis de sueros, obteniéndose resultados con porcentajes de recuperación comprendidos entre 94,8 y 101,5%.



Encapsulation of glucose oxidase within poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate microparticles for developing an amperometric glucose biosensor

J.P. Hervás Pérez^a, E. López-Cabarcos^b, B. López-Ruiz^{a,*}

^a Sección Departamental de Química Analítica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain

^b Departamento de Físico-Química Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

Received 18 September 2007; received in revised form 21 December 2007; accepted 7 January 2008
Available online 21 January 2008

Abstract

Poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate (PEGMEM) microparticles were synthesized and glucose oxidase (GOx) was immobilized within the microparticles. An amperometric biosensor was fabricated using the microparticles with GOx as biological component. The enzyme immobilization method was optimized by investigating the influence of monomer concentration and cross-linker content used in the preparation of the microparticles in the response of the biosensor. The best analytical results were obtained with the microparticles prepared with 0.21 M PEGMEM and 0.74% cross-linking. Furthermore, we have investigated the influence on the biosensor behaviour of parameters such as working potential, pH, temperature and enzymatic load. In addition, analytical properties such as sensitivity, linear range, response time and detection limit were determined. The biosensor was used to determine glucose in human serum samples and to avoid common interferents present in human serum such as uric and ascorbic acids. A Nafion layer was deposited on the electrode surface with satisfactory results. The useful lifetime of the biosensor was at least 520 days.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Amperometric biosensor; PEGMEM; Glucose oxidase; Microparticles

1. Introduction

Glucose biosensors have attracted great interest because of the increasing incidence of diabetes in the population of developed countries [1,2]. The performance of a biosensor depends on the materials and fabrication techniques. The use of biocompatible materials will allow the monitorization *in vivo* of the different compounds such as glucose or cholesterol. Future progress and development in biosensor design will inevitably focus upon the technology of new materials that promise to solve the biocompatibility problems. Materials with hydrogel-like properties are generally biocompatibility due to their high water content [3] and can be used to immobilize enzymes such as GOx. The immobilization of enzymes with complete reten-

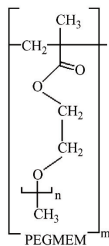
tion of its biological activity in matrices with good diffusion properties for substrates is a decisive factor for the development of biosensors. Various methods for enzyme immobilization have been reported, such as covalent binding [4,5], entrapment in a suitable matrix [6,7], adsorption onto insoluble materials [8], conjugation [9], ionic-covalent hybridization [10,11], etc.

Besides, GOx (EC 1.1.3.4) is a very robust enzyme that is often used as model for testing and developing new immobilization systems such as polymer films, polymer gels, conducting polymers, and methacrylate-based polymers that have been assayed for developing glucose biosensors [12–17].

After the pioneer work in the 1960s [18], the use of methacrylate hydrogels in biomedical applications has made remarkable progress in the field of biosensors, drug delivery systems, contact lenses and synthetic membranes [7,11,19–23].

PEGMEM (see Scheme 1) has been copolymerized with different cross-linkers to form comb-like copolymers with hydrogel

* Corresponding author. Tel.: +34 91 394 1756; fax: +34 91 394 1754.
E-mail address: bealopru@farm.ucm.es (B. López-Ruiz).



Scheme 1. Structure of PEGMEM.

properties because it is a non-cytotoxic, monofunctional and biocompatible polymer [24–26].

In this work we have prepared biocompatible microparticles of *p*-PEGMEM and we have used them as a new system of immobilization of GOx for application as biological component of an amperometric glucose sensor. The biosensor was optimized by studying the influence on the biosensor response of parameters used in microgel synthesis such as monomer concentration and cross-linking content as well as working conditions such as working potential, pH of the medium, temperature, and enzymatic load.

2. Experimental

2.1. Chemicals

PEGMEM, GOx (425 IU/mL) from *Aspergillus niger*, D-glucose, ascorbic acid, uric acid and Nafion 5 wt.% were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). *N,N'*-Methylenebisacrylamide (BIS) from Aldrich (St. Louis, MO, USA), ammonium persulfate, *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED) and the surfactant Span 80 from Fluka (Buchs, Switzerland). Acetate/phosphate buffer solutions were prepared from stock solutions of sodium dihydrogen phosphate and sodium acetate (Panreac). The dialysis membrane (12,000–14,000 MWCO) was purchased from Spectrum Medical Industries. All reagents were used as received and the water was Milli Q quality (Millipore, Milford, MA, USA).

2.2. Apparatus and measurements

The microgel particles were examined using scanning electron microscopy (SEM) in a JEOL JSM-6400 microscope operating at an acceleration voltage of 20 kV and 5000 magnification. The grid with the microparticles was dried, and replicas were produced by shadowing with gold deposited with a Balzers Sputter Coater (SCD-004). Particle size measurements in the range 2–150 μm were performed with a Galai-Cis-1 particle analyzer system. The instrument consists of a laser-based analyzer which evaluates the particle diameter from the time it takes to cross a laser beam and a video-based analyser shows the shape of the microparticle. Amperometric measurements at constant potential were carried out at a

Metrohm Polarecord potentiostat, Model E-506. The pH of the buffer solution was adjusted using a Mettler Toledo MP-230 pH-meter. Electrochemical measurements were performed in 0.05 M acetate/0.05 M phosphate buffer, in a three-electrode cell with a platinum electrode as working electrode, a SCE reference electrode and a platinum counter electrode.

2.3. Emulsion preparation

p-PEGMEM microgels with varying amounts of BIS were prepared using the concentrated emulsion polymerization method [27]. The immobilization of GOx was carried out by adding the enzyme (425 IU/mL) in the aqueous phase of the concentrated emulsion. The amount of cross-linking $\eta(\%) = n_{\text{BIS}}/(n_{\text{BIS}} + n_{\text{monomer}})$ where n_{BIS} and n_{monomer} are the number of moles of BIS and monomer, respectively was varied between 0.34% and 5.82%. Since the time of synthesis is about 1.5 h, the temperature was controlled and kept below 25 °C to preserve the enzyme properties.

2.4. Overall reaction of the glucose biosensor

The electrode surface (diameter 3 mm) was polished with 0.05 μm alumina slurry paste. After polishing, any residual abrasive particles were removed ultrasonically in ethanol and subsequently in distilled water. An exactly weighed amount of microgel particles was placed on the electrode surface and fixed with a dialysis membrane. The resulting electrode was washed with phosphate buffer and overoxidized at +0.6 V versus SCE until the background current decreased to a constant level.

The biosensor response is based on an indirect measurement that correlates the amount of glucose with the concentration of hydrogen peroxide. Because the redox centres in GOx are insulated within the enzyme molecule, direct electron transport to the surface of the electrode does not occur to any measurable degree. GOx is first reduced by the substrate glucose and then reoxidized by oxygen. Oxygen behaves as electron acceptor for reduced GOx leading to the formation of hydrogen peroxide that is oxidized at the electrode and results in the current that is detected by amperometry.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of the microparticles

Fig. 1 shows a micrograph of *p*-PEGMEM microparticles with entrapped GOx prepared with $\eta=0.74\%$. The microgels are spherical and polydisperse.

As Fig. 2 shows, the concentrated emulsion polymerization method produces microparticles with entrapped GOx whose diameters lie between 2 and 12 μm . The average size is 5.2 μm very close to the average size 5 μm of the microparticles without GOx and cross-linking $\eta=0.74\%$. As Fig. 2 illustrates, 50% of the microparticles present a size comprised between 2 and 4 μm .

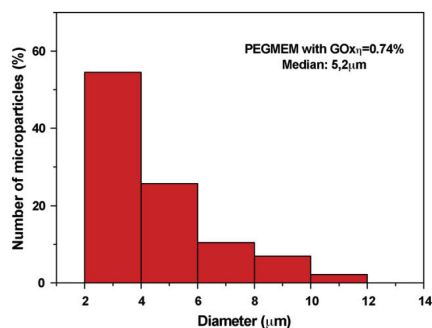


Fig. 1. SEM micrograph of freeze-dried *p*-PEGMEM microparticles with entrapped GOx.

3.2. Optimization of the synthesis method

3.2.1. Monomer concentration

The steady-state response curves, obtained at the platinum electrode with *p*-PEGMEM microparticles synthesized at pH 6.5, $\eta = 0.74\%$, containing 425 IU/mL of GOx and different proportions of monomer in the aqueous phase (0.10, 0.21, 0.83 and 1.17 M) are illustrated in Fig. 3a. The maximum current response was found when the monomer concentration was 0.21 M. A further increase in the monomer concentration decreases the current response and we attribute this behaviour to a higher diffusional barrier that hinders the motion of the substrate towards the enzyme catalytic site as well as the diffusion of the product of the enzymatic reaction towards the electrode. Decreasing the monomer concentration at 0.10 M also results in a decrease of the response, due to the loss of immobilized enzyme when small amount of monomer is used. The enzymatic activity observed in the supernatant liquid obtained after the synthesis of the microparticles when the monomer concentration is 0.10 M seems to support this interpretation.

3.2.2. Effect of the cross-linking contents

In order to find the optimum pore size of the polymer matrix, biosensors based on microparticles with different amount of

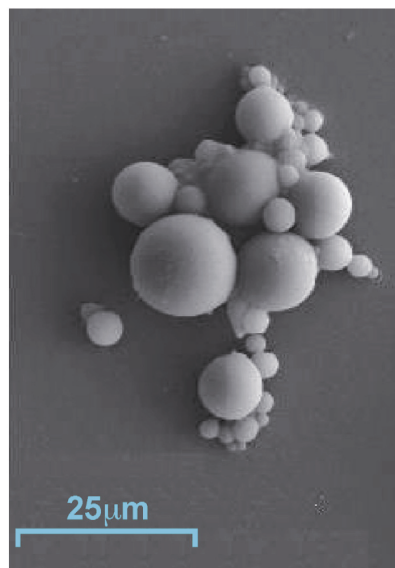


Fig. 2. Size distribution of the *p*-PEGMEM microparticles with entrapped GOx, in phosphate buffer pH 6.5 and 25 °C.

cross-linking (η) were prepared. Fig. 3b shows the calibration curves of the biosensor response versus glucose concentration for microparticles with cross-linking between 0.34% and 5.82%. The monomer concentration selected to obtain these curves was 0.21 M, and the amount of GOx 425 IU/mL.

The optimum response occurs in microgels with $\eta = 0.74\%$. Microparticles prepared with lower fractions of cross-linking present a pore size too large to efficiently retain the enzyme as it was confirmed by the enzymatic activity measured in the supernatant. The decrease of the response when the cross-linking fraction is higher than 0.74% is attributed to a higher substrate diffusional barrier imposed by the cross-linking. Accordingly

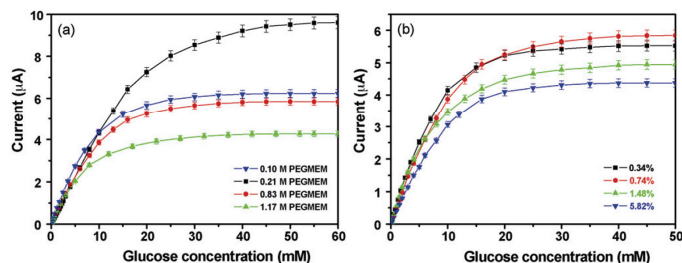


Fig. 3. Response of the glucose biosensor to different monomer concentrations (a) and to different cross-linking (b), by calibration plot for glucose in stirred 0.1 M phosphate buffer, pH 6.5, potential of +0.6 V vs. SCE and 25 °C.

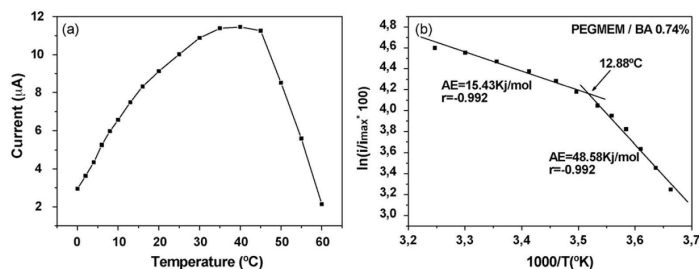


Fig. 4. Effect of working temperature (a) and Arrhenius plot (b) for GOx immobilized in *p*-PEGMEM $\eta = 0.74\%$, on the biosensor response to 30 mM of glucose. Experimental conditions: 0.1 M phosphate buffer, pH 6.5 and +0.6 V vs. SCE.

microparticles with cross-linking 0.74% and monomer concentration 0.21 M were selected for subsequent measurements performed in this work.

3.3. Optimization of the biosensor response

3.3.1. Working potential

The dependency of the biosensor response (steady-state current at the electrode) on the applied potential was investigated in 0.1 M phosphate buffer solution, pH 6.5 containing 0.25 mM glucose. The response of the enzyme electrode increased with the applied potential up to a value of +0.60 V versus SCE and levels off after this value. The operating potential of +0.60 V versus SCE was used in all subsequent measurements.

3.3.2. Temperature

The effect of temperature on the biosensor response at 30 mM glucose was studied in the interval 0–60 °C performing all measurements under oxygen saturation condition and keeping the pH constant at 6.5.

As it can be seen in Fig. 4a, the optimum temperature for enzymatic activity is between 35 and 45 °C. The temperature of maximum activity of the free enzyme is 30 °C [28]. It seems that the immobilizing support slightly protects the enzyme. Although we have checked that the highest enzyme activity takes place between 35 and 45 °C, we wanted to verify that to these temperatures the enzyme was staying stable. To probe this, the kinetics of degradation to different temperatures that suffers the biosensors with 30 mM of glucose was studied, keeping constant the temperature for 1 h, verifying the intensity on time 0 and on 60 min (Table 1). When the temperature was overcoming 30 °C,

a decrease of the activity with time was observed, due to the enzyme denaturation.

The temperature of 30 °C was chosen as working temperature to all further experiments.

As Fig. 4b also illustrates, the Arrhenius plot for GOx immobilized in *p*-PEGMEM microparticles with $\eta = 0.74\%$ presents two regions. The activation energies were calculated from the slopes and were found to be 15.43 and 48.58 kJ/mol, respectively. The activation energy observed in the low temperature region is significantly higher than the one reported for the free enzyme, which was found to be 14.6 kJ/mol [29]. The activation energies values reported by Rubio Retama et al. [30] when GOx was immobilized in polyacrylamide were found to be 26.60 and 50.46 kJ/mol, quite similar than we observed.

As we reported in previous articles, the temperature at which the slope changes is related with the volume phase transition of the microgel around the enzyme [30–32]. At a temperature higher than the temperature of the volume phase transition, the microgel is swollen, the enzyme is surrounded by water and its activation energy comes closer to that of the enzyme in solution. However, in the shrunk phase the amount of water retained inside the hydrogel decreases, hindering access of the substrate to the enzyme and the enzyme–substrate union so the activation energy is increased. These results, as the ones obtained in previous works [30–32], seem to indicate that the changes in the Arrhenius plots are not due to changes in enzyme, but to the medium around it.

3.3.3. pH

The influence of pH on the glucose biosensor response to 30 mM glucose was checked in 0.05 M acetate/0.05 M phosphate

Table 1
Kinetics of degradation of enzyme entrapped in microparticles with 0.74% cross-linking

Temperature (°C)	Current, $t = 0$ s (nA)	Current, $t = 60$ s (nA)	Percentage of degradation
25	120	120	0.00
30	145	145	0.00
35	175	150	14.29
40	205	165	19.51

Experimental conditions: 0.1 M phosphate buffer, pH 6.5 and +0.6 V vs. SCE.

buffer solutions from pH 4.0 to 8.0 at 25 °C. The optimal pH was found to be 6.5 coincident with the optimum pH reported to the free enzyme, which indicates that the catalytic function of the GOx does not seem to be affected by the immobilization process proposed in this work.

3.3.4. Loading

The glucose levels of diabetic patients are higher than 5 mM, therefore, we have extended the calibration range of the biosensor studying the effect of enzymatic load on the biosensor response. Based on previous works [31] we have chosen an enzymatic load of 425 IU/mL and we tested two methods of modifying the amount of enzyme in the surface of the electrode: varying the amount of microparticles placed on electrode surface, and changing the amount of enzyme immobilized within the microgel.

The linear range reaches to 8.0×10^{-3} M when the amount of GOx in aqueous phase goes from 255 to 765 IU/mL and is slightly increased when the microparticles placed on the electrode surface from 1 up to 3 mg. In both cases the sensitivity is increased when the amount of GOx in aqueous phase goes from 255 to 765 IU/mL and when the microparticles placed on the electrode surface from 1 up to 3 mg. In base of the above results we have selected for later experiments 3 mg of microparticles loaded with 765 IU/mL GOx. Table 2 shows the analytical properties of the biosensor prepared with *p*-PEGMEM microgels as a function of the amount of microparticles placed on electrode surface and the enzyme immobilized into the microgel.

Under all the optimal experimental conditions (0.74% cross-linking, potential +0.6 V, pH 6.5 and 30 °C), we realized a calibration curve in which the glucose biosensor presented a sensitivity of $17.78 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$, a maximum current density of $148.57 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$, a linear range between 2.0×10^{-6} and 7.6×10^{-3} M and a detection limit of $1 \text{ } \mu\text{M}$. When comparing the results obtained with the proposed biosensors and that previously reported using a similar immobilization system (polymeric microparticles), an improvement is observed in the analytical properties as sensitivity, that was found to be $17.78 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$, and the maximum current density which increases from 114.3 to $148.57 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$ [30,31]. Also when this device was compared with others using different immobilization system as layer-by-layer self-assembly films or deposition on the electrode surface [33–36], it appears that the stability,

the detection limit and the linear range improved significantly. The detection limit decreased up to 10 times versus the reported devices, the linear range increased at least one order of magnitude and the stability changed from 30 and 150 days in the best of the case (microparticles) to 520 days observed with this biosensor.

3.4. Interference study

It is required that the enzymatic electrode operates at a potential of +0.6 V versus SCE for producing the oxidation of hydrogen peroxide. At this high potential, the H_2O_2 detection may be disturbed by the presence of interfering species such as uric acid (UA) and ascorbic acid (AA) when physiological samples are analyzed because these acids present a negative charge at the working pH (6.0–7.0). The interferences caused by electroactive molecules were reduced by the use of Nafion layer over the electrode surface. Nafion is a negatively charged polyelectrolyte whose effect on the negatively charged substrates is noticeable.

A layer of Nafion (50 μL) was applied on the electrode surface. The layer was dried in air for 15 min and, the electrode with Nafion film was kept at 80 °C for 45 min. Then microparticles of *p*-PEGMEM were placed over the Nafion film and subsequently covered with the dialysis membrane. For biosensor prepared without Nafion (GOx-biosensor), the interfering signals of 0.25 mM uric acid and ascorbic acid are significant (Fig. 5). On the contrary, when the GOx-Nafion-biosensor was used, the signals arising from interferences disappeared. However, current due to 0.25 mM of glucose was near constant, varying from 150 nm in the biosensor without Nafion to 145 nm in biosensor with Nafion.

3.5. Human serum sample analysis

The glucose concentration of five serum pools were analyzed by the GOx-biosensor and GOx-Nafion-biosensor. The glucose of these serums is analyzed also by the spectrophotometric method of hexokinase described by Young [37], which were used as reference method.

The result showed a good correlation with the reference methods, especially in the case of the biosensor prepared with Nafion. Measurements of glucose in serum samples

Table 2

Analytical properties of the *p*-PEGMEM biosensors as a function of the quantity of microparticles placed on electrode surface and the enzyme immobilized into the microparticles

Enzyme load		J_{max} ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	Sensitivity ($\text{mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$)	Linear range (M)	R^2 (n) ^a
Quantity of microparticles in the biosensors (mg)	Quantity of enzyme in the microparticles (IU/mL)				
1	425	62.58	4.09	1.0×10^{-5} to 1.0×10^{-2}	0.9949 (15)
2	425	77.71	6.63	1.1×10^{-5} to 4.0×10^{-3}	0.9944 (12)
3	425	83.49	6.78	1.0×10^{-5} to 4.0×10^{-3}	0.9963 (12)
3	255	54.36	6.13	1.0×10^{-5} to 3.0×10^{-3}	0.9962 (11)
3	765	148.57	17.78	2.0×10^{-6} to 7.6×10^{-3}	0.9985 (15)

^a Points of linear range in calibration curve.

Table 3

Quantitative results obtained from the analysis of the serum by the spectrophotometric method (reference), GOx-biosensor and GOx-Nafion-biosensor

Sample	Glucose (mg/dL) reference method	Glucose ^a (mg/dL) GOx-biosensor	R.S.D. (%)	GOx-biosensor deviations ^b (%)	Glucose ^a (mg/dL) GOx-Nafion-biosensor	R.S.D. (%)	GOx-Nafion-biosensor deviations ^b (%)
1	81	83 ± 1	1.7	+2.0	81 ± 1	1.3	−0.1
2	89	93 ± 2	2.3	+4.3	89 ± 2	2.2	−0.2
3	176	179 ± 1	1.2	+1.5	174 ± 1	1.9	−1.1
4	116	117 ± 1	1.2	+1.0	115 ± 1	1.8	−0.8
5	89	93 ± 1	2.0	+4.5	88 ± 1	1.3	−1.3

^a Average of the three measurements.

^b Deviation between the reference method and the biosensor results.

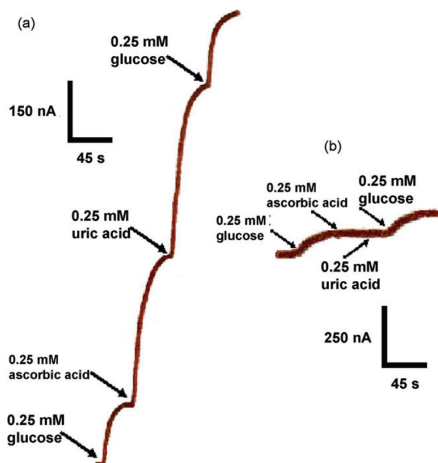


Fig. 5. GOx-biosensor response to 0.25 mM glucose, ascorbic and uric acids (a). GOx-Nafion-biosensor response to 0.25 mM glucose, ascorbic and uric acids (b).

obtained with GOx-Nafion-biosensor were similar with to those of the reference method, and differences between them never overcame 1.3% and with good precision (R.S.D. < 2.3%) (Table 3). The GOx-biosensor gave values 1.0–4.5% higher than those obtained by the reference methods that confirm that the serum samples have interferences. The GOx-Nafion-biosensor gave values −0.1/−1.3% smaller than those obtained by the reference methods, possibly because the layer of Nafion prevents the step of the whole glucose. The recoveries obtained

Table 4

Recovery studies using both glucose oxidase biosensors^a

Sample	Glucose added (mg/dL)	GOx-biosensor		GOx-Nafion-biosensor	
		Glucose found ^a (mg/dL)	Recovery (%)	Glucose found ^a (mg/dL)	Recovery (%)
1	70	70 ± 1	100.2	71 ± 2	101.2
2	70	70 ± 1	100.1	71 ± 2	101.5
3	70	70 ± 1	97.5	70 ± 2	100.0
4	70	70 ± 1	94.8	70 ± 2	99.6
5	70	70 ± 1	99.3	70 ± 1	100.0

^a Average of the three measurements.

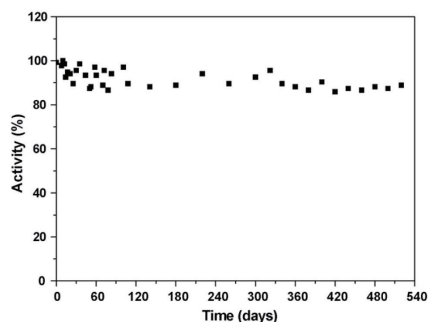


Fig. 6. Storage stability profiles for *p*-PEGMEM biosensor. The biosensor was stored frozen in phosphate buffer at −4 °C when not in use.

with both biosensors are between about 94.8 and 101.5% (Table 4).

3.6. Stability

To characterize the electrode stability, they were stored in a frozen phosphate buffer solution pH 6.0 and, periodically, the response of the biosensor to 0.25 mM glucose solution, at potential +0.6 V versus SCE, 30 °C was measured. We have found that biosensor exhibits an 85% of the initial signal after 520 days. This study is still on course (Fig. 6).

3.7. Analytical properties

The repeatability and reproducibility of glucose biosensors based on *p*-PEGMEM microparticles were evaluated in buffer

solution. For the repeatability, 10 successive measurements of 0.25 mM glucose solution were performed. The relative standard deviation (R.S.D.) was 5.7%. The reproducibility of the analytical response obtained for three different electrodes when 5 mM of glucose was added (three measurements with each biosensor), obtained a R.S.D. of 0.88%.

4. Conclusions

Microparticles based on *p*-PEGMEM are presented as interesting matrix for GOx immobilization. We have demonstrated its application as enzyme immobilization support for an amperometric glucose biosensor. The optimal conditions of the synthesis medium were initiator's concentration of 10.96 mM, monomer concentration of 208.25 mM and 0.738% cross-linking content. Furthermore, the response of the biosensor was optimized for glucose detection. The optimal conditions of the biosensor response were: pH 6.5, 30 °C, 3 mg and 765 IU/mL. For eliminating the interferences caused by species with negative net charge, we have utilized a Nafion layer covering the electrode surface. The biosensor has been successfully applied to the determination of glucose in serum samples. The biosensor maintains 85% of the initial response 15 months later of the first use.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from the Spanish Science and Education Ministry (MAT2006-13646-C03-01) from the CAM-UCM Program for "Consolidation of Research Groups" no. 950247 and no. 911033. We also thank M.E. Gil-Alegre (Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, UCM) and A. Rodríguez (Electron Microscopy Centre, UCM) for valuable technical and professional assistance.

References

- [1] B.D. Malhotra, A. Chaubey, *Sens. Actuators B* 91 (2003) 117.
- [2] S. Chinnayelka, M.J. McShane, *Biomacromolecules* 5 (2004) 1657.
- [3] V. Kudela, *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, vol. 7, Wiley, New York, 1987, p.783.
- [4] L. Doretti, D. Ferrara, S. Lora, G. Palma, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29 (1999) 67.
- [5] S.H. Kim, S. Kim, V.K. Yadavalli, M.V. Pishko, *Anal. Chem.* 77 (2005) 6828.
- [6] S. Braham, D. Narinesingh, A. Guiseppi-Elie, *Anal. Chim. Acta* 448 (2001) 27.
- [7] S. Braham, D. Narinesingh, A. Guiseppi-Elie, *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 53.
- [8] G. Bayramoğlu, E. Yalçin, M.Y. Arica, *Process Biochem.* 40 (2005) 3505.
- [9] T. Konno, J. Watanabe, K. Ishihara, *Biomacromolecules* 5 (2004) 342.
- [10] F.N. Kok, F. Bozuglu, V. Hasirci, *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 531.
- [11] F.N. Kok, V. Hasirci, *Biosens. Bioelectron.* 19 (2004) 661.
- [12] M. Portaccio, M. El-Masry, N.R. Diano, A. De Maio, V. Grano, M. Lepore, P. Travascio, U. Bencivenga, N. Pagliuca, D.G. Mita, *J. Mol. Catal. B: Enzyme* 18 (2002) 49.
- [13] L. Cen, K.G. Neoh, E.T. Kang, *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003) 363.
- [14] X. Liu, K.G. Neoh, L. Cen, E.T. Kang, *Biosens. Bioelectron.* 19 (2004) 823.
- [15] H. Suzuki, A. Kumagai, K. Ogawa, E. Kokufuta, *Biomacromolecules* 5 (2004) 486.
- [16] L.S. Bean, L.Y. Heng, B.M. Yamin, M. Ahmad, *Thin Solid Films* 477 (2005) 104.
- [17] L.S. Bean, L.Y. Heng, B.M. Yamin, M. Ahmad, *Bioelectrochemistry* 65 (2005) 157.
- [18] O. Wichterle, D. Lim, *Hydrophilic gels for biologic use*, in: Nature, St. Martin's Press Inc., NY, 1960, p. 117.
- [19] Y. Yang, S. Mu, H. Chen, *Synth. Metals* 92 (1998) 173.
- [20] P. Van der Wetering, E.E. Moret, N.M.E. Schuueemans-Nieuwenbrock, M.J. Van Steenberghe, W.E. Hennik, *Bioconj. Chem.* 10 (1999) 589.
- [21] A. Blandino, M. Macias, D. Cantero, *Process Biochem.* 36 (2001) 601.
- [22] E.J. Calvo, R. Etchenique, L. Pietrasanta, A. Wolosiuk, C. Danilowicz, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1161.
- [23] C.A. Marquette, L.J. Blum, *Sens. Actuators B* 90 (2003) 112.
- [24] M.A. Janney, O.O. Omatete, S.D. Walls, R.J. Nunn, R.J. Ogle, G. Westmoreland, *J. Am. Ceram. Soc.* 17 (1998) 581.
- [25] M. Potoczek, E. Zawadzka, *Ceram. Int.* 30 (2004) 793.
- [26] S.K. Mallapragada, B.C. Anderson, P.D. Bloom, V.V. Sheares-Ashby, US Patent 6,998,456 (2006) US 2002-357499P.
- [27] B.J. Rubio Retama, B. López-Ruiz, E.J. López-Cabarcos, *Biomaterials* 24 (2003) 2965.
- [28] L. Ying, E.T. Kang, K.G. Neoh, *J. Membr. Sci.* 208 (2002) 361.
- [29] S. Cosnier, S. Szunerits, R.S. Marks, A. Novoa, L. Puech, E. Perez, I. Rico-Lattes, *Talanta* 55 (2001) 889–897.
- [30] B.J. Rubio Retama, E.J. López-Cabarcos, B. López-Ruiz, *Talanta* 68 (2005) 99.
- [31] M. Sánchez-Paniagua López, D. Mecerreyes, E. López-Cabarcos, B. López-Ruiz, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2006) 2320.
- [32] J.P. Hervás Pérez, M. Sánchez-Paniagua López, E. López-Cabarcos, B. López-Ruiz, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2006) 429.
- [33] S.A. Miscordia, J. Desbrières, G.D. Barrera, P. Labbé, G.A. Rivas, *Anal. Chim. Acta* 578 (2006) 137.
- [34] X. Chu, D. Duan, G. Shen, R. Yu, *Talanta* 71 (2007) 2040.
- [35] B.Y. Wu, S.H. Hou, F. Yin, Z.X. Zhao, Y.Y. Wang, X.S. Wang, Q. Chen, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 2854.
- [36] L. Wu, X. Zhang, H. Ju, *Biosens. Bioelectron.* 23 (2007) 479.
- [37] D.S. Young, *Effects of Drug on Clinical Laboratory Test*, third edition, AACC Press, Washington, 1990.

4.5. "Amperometric glucose biosensor based on biocompatible poly(dimethylaminoethyl) methacrylate microparticles". Biosensor amperométrico de glucose formado por micropartículas biocompatibles de poli(dimetil amino etil) metacrilato. *Talanta*, 81, 1197-1202 (2010)

Otra matriz polimérica biocompatible que ensayamos, fue el DMAEM, polímero dependiente del pH en el que se trabaje y poder comparar los resultados obtenidos en la determinación de glucosa entre este polímero y el anterior, temperatura dependiente.

El pKa de este polímero es $\sim 7,5$, lo que significa que por encima de 7,5, cuando en el medio hay gran cantidad de concentración de iones OH⁻, el polímero no presenta carga. Sin embargo para pH < 7,5, se encuentra cargado positivamente. La glucosa oxidasa tiene un pI de 4,2, un pH óptimo de 5,5 y un rango de pH de máxima actividad que se corresponde con 4-7. Se estudiará la posible interacción entre la enzima y el polímero dependiendo del pH de la disolución de trabajo, investigando el efecto de esta interacción en las propiedades analíticas del biosensor.

Se estudió la influencia de diversos parámetros en la respuesta del biosensor, tales como potencial de trabajo, pH del medio y la temperatura, obteniéndose un dispositivo sensible y reproducible para la detección de glucosa con un límite de detección de 1 μM . En el análisis de sueros se obtuvieron resultados con porcentajes de recuperación próximos al 100%, con valores de coeficientes de variación obtenidos para la precisión $\leq 2,2\%$, lo que demuestra la aplicabilidad del biosensor propuesto.



Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta



Amperometric glucose biosensor based on biocompatible poly(dimethylaminoethyl) methacrylate microparticles

J.P. Hervás Pérez^a, E. López-Cabarcos^b, B. López-Ruiz^{a,*}

^a Sección Departamental de Química Analítica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain

^b Departamento de Físico-Química Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 July 2009

Received in revised form 25 January 2010

Accepted 4 February 2010

Available online 11 February 2010

Keywords:

Amperometric biosensor

Dimethylaminoethyl methacrylate

Glucose oxidase

Microparticles

ABSTRACT

Glucose oxidase (GOx) has been immobilized within poly(dimethylamino) ethyl methacrylate (p-DMAEM) microparticles which were subsequently used as biological material in the fabrication of a glucose biosensor. The enzyme immobilization method was optimized in relation with the monomer concentration and cross-linker content. It was found that the best biosensor response corresponds to microparticles synthesized with 1.19 M monomer and 0.37% cross-linking content. Furthermore, the influence on the biosensor response of parameters such as working potential, pH, temperature, and loaded enzyme were investigated. In addition, analytical properties such as sensitivity, linear range, response time, and detection limit were determined. The biosensor was used to analyze glucose in human serum samples with satisfactory results. The useful lifetime of the biosensor is at least 520 days.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Research on glucose biosensors has attracted great interest due to the increasing incidence of diabetes in the population of developed countries and the need of such devices to monitor glucose levels [1,2]. The fabrication of biosensors with biocompatible materials will allow the monitorization *in vivo* of glucose and other compounds. Future progress in biosensors design will certainly focus upon the technology of new materials that solve the biocompatibility problem. Another decisive factor is the immobilization of enzymes, with complete retention of their biological activity, in matrices with good diffusion properties for substrates. Various methods for enzyme immobilization have been assayed such as covalent binding [4,5], entrapment in a suitable matrix [6,7], adsorption onto insoluble materials [8], conjugation [9], ionic-covalent hybridization [10,11], etc. Materials with hydrogel-like properties are good candidates to solve the above problems since they are generally biocompatible due to their high water content [3], can be used to immobilize enzymes, and their porosity can be varied controlling the cross-linker content during the synthesis.

After the pioneer work of Wichterle and Lim in the sixties [18], the use of methacrylate hydrogels in biomedical applications has made remarkable progresses in the field of biosensors, drug delivery systems, contact lenses, and synthetic membranes [7,11,19–23]. Among methacrylates p-DMAEM (see Scheme 1) is

widely used as drug delivery system, and in contact lenses since is biocompatible, pH sensitive, and thermoresponsive [24–30].

In the present work, GOx from *Aspergillus niger* (EC 1.1.3.4) was taken as model redox enzyme because of its high stability, good catalytic ability, commercial availability, and moderate cost. Moreover, GOx is a widely studied enzyme that provides a suitable model system for the development of enzyme electrodes [12–17].

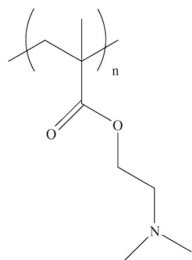
We have investigated GOx immobilization in p-DMAEM matrices with the aim to compare the results obtained with this biosensor and those previously reported by our group using different polymer immobilization system [31–33]. Biosensors prepared with p-DMAEM present an improvement in sensibility and maximum current density in comparison with previous reported devices.

2. Experimental

2.1. Chemicals

DMAEM, GOx (EC 1.1.3.4) (425 IU/mL) from *A. niger*, D-glucose, ascorbic acid, uric acid and Nafion 5 wt.% (Nafion purum 5% in a mixture of lower aliphatic alcohols and water), were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). *N,N'*-methylenebisacrylamide (BIS) from Aldrich (St. Louis, MO, USA), ammonium persulfate, *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED) and the surfactant Span 80 from Fluka (Buchs, Switzerland). Acetate/phosphate buffer solutions were prepared from stock solutions of sodium dihydrogen phosphate and sodium acetate (Panreac). The dialysis membrane (12,000–14,000 MWCO) was purchased from Spectrum Medical

* Corresponding author. Tel.: +34 91 394 1756; fax: +34 91 394 1754.
E-mail address: bealopru@farm.ucm.es (B. López-Ruiz).



Scheme 1. Structure of p-DMAEM.

Industries. All reagents were used as received and the water was Milli Q quality (Millipore, Milford, MA, USA).

2.2. Apparatus and measurements

Scanning electron micrographs (SEM) of the microparticles were obtained with a JEOL JSM-6400 microscope operating at an acceleration voltage of 20 kV and 5000 \times magnification. The grid with the microparticles was dried, and replicas were produced by shadowing with gold deposited with a Balzers Sputter Coater (SCD-004). Particle size measurements in the range 2–150 μm were performed with a Galai-Cis-1 particle analyzer system. The pH of the buffer solution was adjusted using a Mettler Toledo MP-230 pH-meter. Amperometric measurements at constant potential were carried out at a Metrohm Polarecord Potentiostat, Model E-506. Electrochemical measurements were performed in 0.05 M acetate/0.05 M phosphate buffer and in 0.1 M phosphate buffer, using a three-electrode cell with a platinum electrode as working electrode, a SCE reference electrode and a platinum counter electrode. Calibration plots were obtained by measuring the current response, after successive additions of substrate solution into a stirred electrolyte solution (10 mL), corresponding to the enzyme saturation concentration. The linear part of these calibration plots was fitted in order to obtain the best correlation coefficient R^2 . Sensitivity was expressed as the slope of the calibration curve. Detection limit was calculated according with the criterion of ratio signal-to-noise equal 3. The response time was the time needed to reach 95% of the steady-state current after a substrate addition.

2.3. Emulsion preparation and microparticles synthesis

p-DMAEM microparticles with varying amount of BIS were prepared using the concentrated emulsion polymerization method, following the procedure previously published [34]. The immobilization of GOx was carried out by adding the enzyme (425 IU mL $^{-1}$) to the aqueous phase of the concentrated emulsion. The amount of cross-linking ($\eta = n_{\text{BIS}} / (n_{\text{BIS}} + n_{\text{monomer}}) \%$ where n_{BIS} and n_{monomer} are the number of moles of BIS and monomer respectively) was varied between 0.25% and 1.48%. During the synthesis of the microgels (around 1.5 h) the temperature was controlled and kept below 25 $^{\circ}\text{C}$ to preserve the enzyme properties.

2.4. Overall reaction of the glucose biosensor

The electrode surface (diameter 3 mm) was polished with 0.05 μm alumina slurry paste. After polishing, any residual abrasive particles were removed ultrasonically in ethanol and subsequently in distilled water. An exactly weighed amount of microgel particles was placed on the electrode surface and fixed with a dialysis mem-

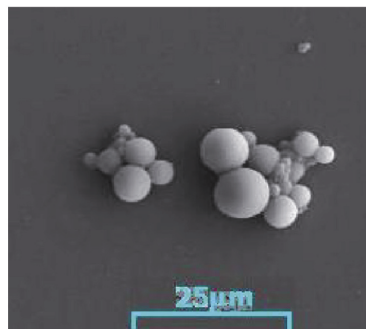


Fig. 1. SEM micrograph of freeze-dried p-DMAEM microparticles with entrapped GOx.

brane. The resulting electrode was washed with phosphate buffer and overoxidized at +0.6 V vs. SCE until the background current decreased to a constant level.

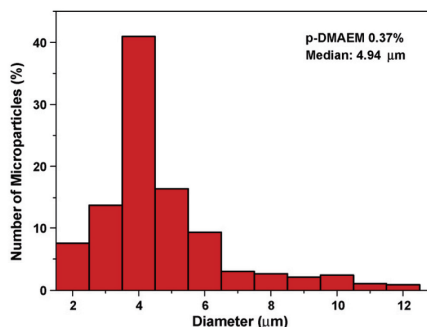
The biosensor response is based on an indirect measurement that correlates the amount of glucose with the concentration of hydrogen peroxide. Because the redox centres in GOx are buried within the molecule, direct electron transport to the surface of the electrode does not occur to any measurable degree. GOx is first reduced by the substrate glucose and then reoxidized by oxygen. Oxygen behaves as electron acceptor for reduced GOx leading to the formation of hydrogen peroxide that is oxidized at the electrode and the resulted current is detected by amperometry.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of the microparticles

Fig. 1 illustrates a micrograph of p-DMAEM microparticles with entrapped GOx prepared with $\eta = 0.37\%$, the microgels are spherical and polydisperse.

As Fig. 2 shows, the concentrated emulsion polymerization method produces microparticles with entrapped GOx whose diameters lie between 2 and 12 μm . The average size was 4.94 μm very

Fig. 2. Size distribution of the p-DMAEM microparticles with entrapped GOx, in phosphate buffer pH 6.0 and 25 $^{\circ}\text{C}$.

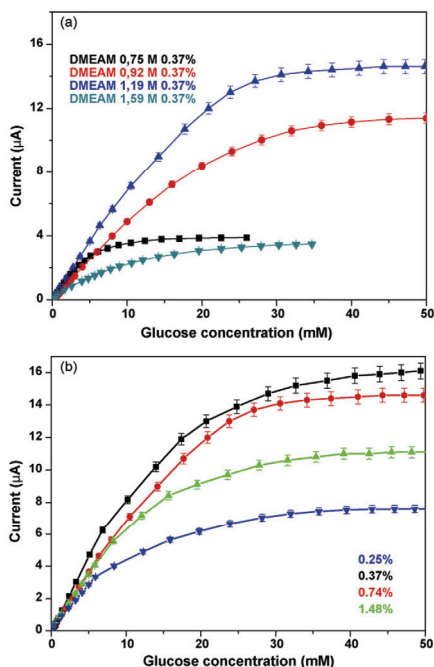


Fig. 3. Calibration curves for glucose, as a function of monomer concentration of the microgel (cross-linking 0.37%) (a) and cross-linking content (1.19 M of monomer) (b), in a stirred 0.1 M phosphate buffer solution, pH 6.0, potential of +0.6 V vs. SCE and 25 °C.

close to the 5 μm average size of the microparticles prepared without GOx and with the same cross-linking content. As can be seen in Fig. 2, around 75% of the microparticles present a size comprised between 3 and 5 μm .

3.2. Optimization of the synthesis method

3.2.1. Monomer concentration

Fig. 3a shows the steady-state response curves obtained at the platinum electrode with p-DMAEM microparticles synthesized at pH 6.0, $\eta = 0.37\%$, containing 425 IU mL^{-1} of GOx, and different concentration of monomer in the aqueous phase (0.75, 0.92, 1.19, and 1.59 M). The maximum current response was found for monomer concentration 1.19 M. A further increase in the monomer concentration decreases the current response. This behaviour is attributed to the decreasing of pore size with increasing monomer concentration that introduces a higher diffusional barrier hindering the motion of both, the substrate towards the enzyme catalytic site, and the product of the enzymatic reaction towards the electrode. Decreasing the monomer concentration down to 0.75 M also results in a decrease of the response due to the loss of immobilized enzyme as it was demonstrated by measuring enzymatic activity in the supernatant liquid obtained after the synthesis of the microgels.

Table 1

Kinetics of degradation of enzyme entrapped in microparticles with 0.37%. Experimental conditions: 0.1 M phosphate buffer pH 6.0 and +0.6 V vs. SCE.

Temperature (°C)	Current $t = 0$ s (nA)	Current $t = 60$ s (nA)	Percentage of degradation
25	350	350	0.0
30	445	445	0.0
35	475	435	8.4
40	495	445	10.1

3.2.2. Effect of the cross-linking content

Microparticles with different amount of cross-linking, η , were prepared with the aim to optimize the pore size of the polymer matrix for preparation of biosensors. Fig. 3b shows the calibration curves of the biosensor response vs. glucose concentration for microparticles with cross-linking between 0.25% and 1.49%. The monomer concentration selected to obtain these curves was 1.19 M, and the amount of entrapped GOx was 425 IU/mL.

The optimum response occurs for microgels with $\eta = 0.37\%$. Microparticles prepared with lower fractions of cross-linking present a pore size too large to efficiently retain the enzyme. By contrast, the decrease of the response for $\eta \geq 0.37\%$ is attributed to a higher substrate diffusional barrier imposed by the cross-linking. Accordingly, microparticles with $\eta = 0.37\%$ and monomer concentration 1.19 M were selected for subsequent measurements performed in this work to optimize the biosensor response with respect to the working conditions.

3.3. Optimization of the biosensor response

3.3.1. Working potential

The dependency of the biosensor response (steady-state current at the electrode) on the applied potential was investigated in 0.1 M phosphate buffer solution, pH 6.0, containing 0.25 mM glucose. The response of the enzyme electrode increased with the applied potential up to +0.60 V vs. SCE and levels off for higher values. The operating potential of +0.60 V vs. SCE was used in all subsequent measurements.

3.3.2. Temperature

The effect of the temperature on the biosensor response at 30 mM glucose was studied in the interval 0–60 °C performing all measurements under oxygen saturation conditions and keeping the pH constant at 6.0. As can be seen in Fig. 4a, the optimum temperature lies between 35 and 45 °C. The temperature of maximum activity of the free enzyme was 30 °C [35]. It seems that the immobilizing matrix slightly improves the thermal stability of the enzyme. In order to check the enzyme stability in this temperature range we have investigated the kinetics of degradation keeping constant the temperature for 1 h and measuring the current intensity on time 0 and after 60 min. The results presented in Table 1 indicate that when the temperature surpasses 30 °C the current decreases due to the beginning of enzyme denaturation.

However, the loss of the activity of the immobilized enzyme is slower than that of the free enzyme, and it seems that the polymer matrix has a somewhat protective effect at high temperatures. It has been reported, that the conformational flexibility of enzymes is affected by immobilization which is reflected by an increase in the stability towards denaturation by raising the temperature [36,37]. According to the above results, 30 °C was chosen as working temperature for all further experiments.

As is shown in Fig. 4b, the Arrhenius plot presents two regions. The activation energies calculated from the slopes and were 23.31 and 43.11 kJ/mol. The activation energy in the low temperature region is significantly higher than the one reported for the free enzyme, 14.6 kJ/mol [38]. Similar activation energies of 26.60 and

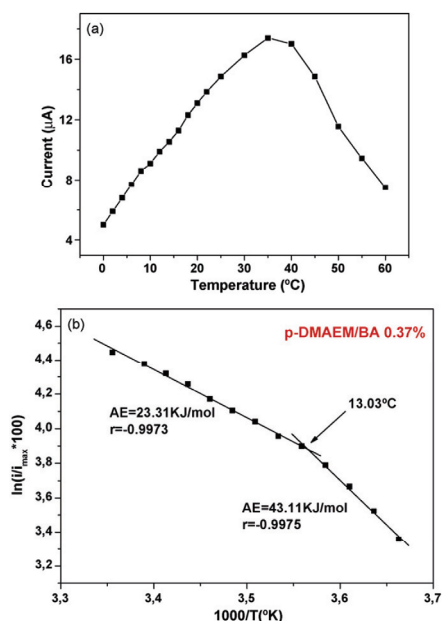


Fig. 4. Effect of working temperature on the biosensor response (a), and Arrhenius plot (b) for GOx immobilized in p-DMAEM, $\eta=0.37\%$, 30 mM of glucose. Experimental conditions as in Fig. 3.

50.46 kJ/mol were reported for GOx immobilized in polyacrylamide microgels [31], and of 15.43 and 48.58 kJ/mol for GOx immobilized in poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate microparticles [32]. It seems that GOx has a disfavoured conformation in the immobilized state, resulting in a smaller catalytic effect compared to the free enzyme.

Thermoresponsive polymers exhibit a conspicuous volume phase transition from swollen to collapsed states which could also influence the enzymatic activity [31,33,39,40]. Thus, the two linear regions observed in the Arrhenius plots would roughly be associated with the two different polymer environments surrounding the entrapped enzyme [38,41]. The transition from de swollen to the collapse states of the microgel might provoke changes not only

in enzyme conformation but also in enzyme accessibility for the substrate.

3.3.3. pH

The influence of pH on the glucose biosensor response to 30 mM glucose was checked in 0.05 M acetate/0.05 M phosphate buffer solutions from pH 4.0 to 8.0 at 25 °C. The optimal pH was found to be 6.0 coincident with the optimum pH reported for the free enzyme which indicates the catalytic function of GOx is not affected by the immobilization process.

3.3.4. Loading

Glucose levels of diabetic patients are higher than 5 mM, therefore, with the aim of a possible application, we have extended the calibration range of the biosensor. Based on previous works [32] we have chosen as reference an enzymatic load of 765 IU/mL and we tested two methods of modifying the amount of enzyme in the surface of the electrode: (i) changing the amount of enzyme immobilized within the microgel, and (ii) varying the amount of microparticles placed on electrode surface. The linear range reaches 8.0×10^{-3} and 6.0×10^{-3} M when the amount of GOx used in the synthesis is 255 and 765 IU/mL respectively. These values slightly increased by increasing the amount of microparticles placed on the electrode surface from 1 up to 3 mg. However in both cases the sensitivity increased and for this reason we have selected for later experiments microparticles prepared with 765 IU/mL GOx and a load of 3 mg of microparticles on the electrode. Table 2 summarizes the analytical properties of the biosensors prepared with the later conditions.

3.4. Analytical properties

Under optimal conditions ($\eta=0.37\%$, potential +0.6 V, pH 6.0 and 30 °C), we realized a calibration curve in which the glucose biosensor presented the following properties: sensitivity of $23.4 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$, maximum current density $264.7 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$, linear range between 9.0×10^{-6} and 6.0×10^{-3} M, and detection limit $1 \text{ } \mu\text{M}$. These results present an improvement in sensitivity (from 17.8 up to $23.4 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$) and maximum current density (from 114.3 to $264.7 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$) when compared with similar immobilization systems (polymeric microparticles) previously reported [31–33].

The precision of the biosensor was evaluated in terms of repeatability by performing 10 successive measurements at different substrate solutions. The glucose concentration of the solutions covered the whole linear range (0.25, 2.5, and 5.0 mM). The relative standard deviation (RSD) obtained for each concentration was 5.7%, 2.9%, and 1.8% respectively. Our results were compared with those obtained using the Horwitz equation [42], $\text{RSD}(\%) = 2^{(1-0.5 \log C)}$, and in all cases the RSD was lower than the Horwitz accepted values. In addition, 20 measurements at 2.5 mM glucose (intermediate con-

Table 2

Analytical properties of the p-DMAEM biosensors as a function of the quantity of microparticles placed on electrode surface and the enzyme immobilized into the microparticles. Experimental conditions: 0.1 M phosphate buffer, pH 6.0 and +0.6 V vs. SCE.

Enzyme load		Sensitivity ($\text{mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$)	J_{max} ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	Lineal range (M)	R^2 (N°) ^a	DL (μM)
Quantity of microparticles in the biosensors (mg)	Quantity of enzyme in the microparticles (IU/mL)					
1	765	5.6	85.8	2.0×10^{-6} to 6.7×10^{-3}	0.9992 (18)	20
2	765	7.5	136.4	3.0×10^{-6} to 6.8×10^{-3}	0.9994 (18)	10
3	255	9.5	152.9	1.0×10^{-6} to 12.1×10^{-3}	0.9946 (22)	20
3	425	13.4	230.0	9.0×10^{-6} to 6.9×10^{-3}	0.9993 (21)	20
3	765	23.4	264.7	9.0×10^{-6} to 10.2×10^{-3}	0.9949 (26)	10
3	1020	10.2	192.3	8.0×10^{-6} to 6.0×10^{-3}	0.9992 (19)	10

^a Points of linear range in calibration curve.

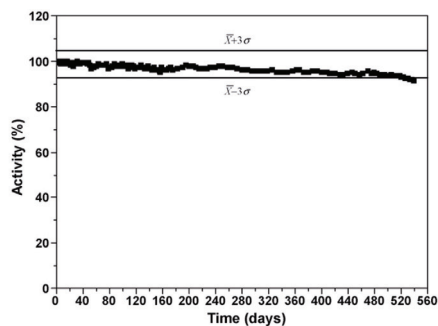


Fig. 5. Storage stability profiles for p-DMAEM biosensor. The biosensor was stored frozen in phosphate buffer at -4°C when not in use.

centration) were performed at two different days. No changes were observed in the average value or in the data dispersion. When comparing the p -value corresponding to the averages and the variances of the measurements carried out each day (p -value = 0.8798 for averages and p -value = 0.8867 for variances) no statistically significant differences were observed.

The electrode stability was investigated during one and a half year (see Fig. 5). The electrode was stored in a frozen phosphate buffer solution pH 6.0 and periodically the response of the biosensor to 0.25 mM glucose solution was measured at potential +0.6 V vs. SCE, and at 30°C . We have found that the biosensor exhibits an 85% of the initial signal 520 days after its preparation.

This biosensor improves significantly the stability, detection limit, and linear range when compared with other devices prepared using different immobilization techniques such as layer-by-layer self-assembly films, or deposition on the electrode surface [43–46]. Thus, the detection limit is 10 times smaller than reported values, the linear range increases one order of magnitude, and the stability improves from 150 up to 520 days observed with this biosensor.

3.5. Interference study

The enzymatic electrode operates at a reading potential of +0.6 V vs. SCE corresponding to the oxidation of hydrogen peroxide. At this potential, the H_2O_2 detection is disturbed by the presence of interfering species such as uric acid (UA) and ascorbic acid (AA) when physiological samples are analyzed since these acids present negative charge at the working pH (6.0–7.0). The interferences caused by electroactive molecules were eliminated using a Nafion layer covering the electrode surface since Nafion is a negatively charged polyelectrolyte whose effect on the negatively charged substrates is noticeable.

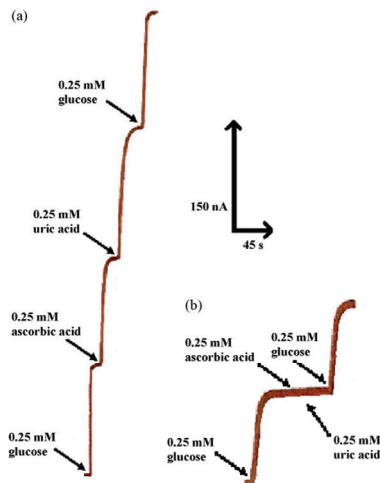


Fig. 6. GOx-biosensor response to 0.25 mM glucose, ascorbic and uric acids (a) and GOx-Nafion-biosensor response to 0.25 mM glucose, ascorbic and uric acids (b).

Thus, a layer of Nafion (50 μL) was applied on the electrode surface. The layer was dried in air for 15 min and subsequently the electrode was kept at 80°C for 45 min. The microparticles of p-DMAEM were then placed over the Nafion film and covered with the dialysis membrane. As is shown in Fig. 6, for a biosensor prepared without Nafion (GOx-biosensor), the interfering signals of 0.25 mM uric acid and ascorbic acid are significant. On the contrary, when the GOx-Nafion-biosensor was calibrated, the signals arising from interferences disappeared (see Fig. 6). However, the current due to 0.25 mM of glucose was slightly affected and remains nearly constant, varying from 150 nA in the biosensor without Nafion to 145 nA in the biosensor with Nafion.

3.6. Human serum sample analysis

The glucose concentration of five serum pools were analyzed using both the GOx-biosensor and GOx-Nafion biosensor. The glucose of these serums was also analyzed by the spectrophotometric method of hexokinase [47] which was used as reference method. The result showed a good correlation with the reference method, especially in the case of the biosensor prepared with Nafion. The glucose concentration calculated with the biosensor without Nafion was always slightly higher than those obtained with the reference method due to the contribution of the ascorbic and uric acids

Table 3
Quantitative results obtained from the analysis of the serum by the spectrophotometric method (reference), GOx-biosensor, and GOx-Nafion-biosensor.

Sample	Glucose (mg/dl) reference method	Glucose ^a (mg/dl) GOx-biosensor	RSD (%)	GOx-biosensor deviations ^b (%)	Glucose ^a (mg/dl) GOx-Nafion biosensor	RSD (%)	GOx-Nafion biosensor deviations ^b (%)
1	93.0	97.7 \pm 0.3	0.3	+4.8	93.5 \pm 0.4	0.4	+0.5
2	89.0	93.0 \pm 2.0	2.0	+4.3	88.0 \pm 2.0	2.2	–0.8
3	99.0	105.0 \pm 2.0	1.9	+6.1	100.7 \pm 0.5	0.5	+1.7
4	91.0	92.0 \pm 1.0	1.2	+1.0	90.0 \pm 1.0	1.0	–0.9
5	83.0	85.0 \pm 1.0	1.0	+2.2	82.9 \pm 0.3	0.3	–0.1

^a Average of three measurements.

^b Deviation: deviation between the reference method and the biosensor results.

Table 4Recovery studies using both glucose biosensors^a.

Sample	Glucose added (mg/dl)	GOx-biosensor		GOx-Nafion-biosensor	
		Glucose found ^a (mg/dl)	Recovery (%)	Glucose found ^a (mg/dl)	Recovery (%)
1	75.5	75.6 ± 0.9	100.2	76.0 ± 2	101.2
2	75.5	75.5 ± 0.9	100.1	76.0 ± 2	101.5
3	75.5	73.6 ± 0.9	97.5	76.0 ± 2	100.0
4	75.5	71.5 ± 0.9	94.8	75.0 ± 2	99.6
5	75.5	74.9 ± 0.9	99.3	76.0 ± 1	100.0

^a Average of tree measurements

oxidation. By contrast, when Nafion was included in the biosensor, the concentration of glucose measured with both methods was similar and the values were never higher than 1.7% with positive and negative deviations. A good precision was obtained with the two biosensors RSD < 2.2% (Table 3). Furthermore, the recoveries observed with both biosensors were always between 94.8% and 101.5% (Table 4).

4. Conclusions

Microparticles based on p-DMAEM present an interesting matrix for GOx immobilization and can be used as biological element in glucose biosensors. The optimal conditions of the synthesis were: monomer concentration 1.19 M and $\eta = 0.37\%$. Furthermore, the response of the biosensor is optimal for the following working conditions: pH 6.0; temperature 30 °C; 3 mg of particles on the electrode; and an enzyme load of 765 IU/mL. The significantly increasing of the stability, detection limit and lineal range, seem the most interesting characteristics of the proposed biosensors, compared with the biosensor previously reported by our research group. The interferences caused by species with negative net charge were eliminated by a Nafion layer covering the electrode surface. The biosensor has been successfully applied to the determination of glucose in serum samples. The biosensor maintains 85% of the initial response 18 months after the first use.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from of the Spanish Science and Innovation Ministry (grant MAT2006-13646-C03-01), from the BSCH-UCM program for "Consolidation of Research Groups" (Group 911033, grant GR58/08; and Group 950247, grant PR1/08.15922-A), and from the COST Action D43. We also thank M.F. Gil-Alegre (Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology) and A. Rodríguez (Electron Microscopy Centre) for technical and professional assistance.

References

- [1] B.D. Malhotra, A. Chaubey, *Sens. Actuators B* 91 (2003) 117.
- [2] S. Chinnayelka, M.J. McShane, *Biomacromolecules* 5 (2004) 1657.
- [3] V. Kudela, *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, vol. 7, Wiley, New York, 1987, p. 783.
- [4] L. Doretto, D. Ferrara, S. Lora, G. Palma, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29 (1999) 67.

- [5] S.H. Kim, S. Kim, V.K. Yadavalli, M.V. Pishko, *Anal. Chem.* 77 (2005) 6828.
- [6] S. Ibrahim, D. Narinesingh, A. Guiseppe-Elie, *Anal. Chim. Acta* 448 (2001) 27.
- [7] S. Ibrahim, D. Narinesingh, A. Guiseppe-Elie, *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 53.
- [8] G. Bayramoğlu, E. Yalcin, M.Y. Arica, *Process Biochem.* 40 (2005) 3505.
- [9] T. Konno, J. Watanabe, K. Ishihara, *Biomacromolecules* 5 (2004) 342.
- [10] F.N. Kok, F. Bozoglu, V. Hasirci, *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 531.
- [11] F.N. Kok, V. Hasirci, *Biosens. Bioelectron.* 19 (2004) 661.
- [12] M. Portaccio, M. El-Masry, N.R. Diano, A. De Maio, V. Grano, M. Lepore, P. Travascio, U. Bencivenga, N. Pagliuca, D.G. Mita, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 18 (2002) 49.
- [13] L. Cen, K.G. Neoh, E.T. Kang, *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003) 363.
- [14] X. Liu, K.G. Neoh, L. Cen, E.T. Kang, *Biosens. Bioelectron.* 19 (2004) 823.
- [15] H. Suzuki, A. Kumagai, K. Ogawa, E. Kokufuta, *Biomacromolecules* 5 (2004) 486.
- [16] L.S. Bean, L.Y. Heng, B.M. Yamin, M. Ahmad, *Thin Solid Films* 477 (2005) 104.
- [17] L.S. Bean, L.Y. Heng, B.M. Yamin, M. Ahmad, *Bioelectrochemistry* 65 (2005) 157.
- [18] O. Wichterle, D. Lim, *Nature, St. Martin's Press Inc.*, New York, 1960, p. 117.
- [19] Y. Yang, S. Mu, H. Chen, *Synth. Metals* 92 (1998) 173.
- [20] P. Van der Wetering, E.E. Moret, N.M.E. Schuuemans-Nieuwenbrock, M.J. Van Steenberghe, W.E. Hennik, *Bioconj. Chem.* 10 (1999) 589.
- [21] A. Blandino, M. Macias, D. Cantero, *Process Biochem.* 36 (2001) 601.
- [22] E.J. Calvo, R. Etchenique, L. Pietrasanta, A. Wolosik, C. Danilowicz, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1161.
- [23] C.A. Marquette, L.J. Blum, *Sens. Actuators B* 90 (2003) 112.
- [24] H. Yu, L.H. Gan, X. Hu, S.S. Venkatraman, K.C. Tam, Y.Y. Gan, *Macromolecules* 38 (2005) 9889.
- [25] G. Zheng, H.D.H. Stover, *Macromolecules* 36 (2003) 7439.
- [26] J. Du, Y. Tang, A.L. Lewis, S.P. Armes, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 17982.
- [27] J.V.M. Weaver, S.P. Armes, V. Büttin, *Chem. Commun.* 18 (2002) 2122.
- [28] M. Sen, M. Sari, *Eur. Polym. J.* 41 (2005) 1304.
- [29] Y.F. Chen, M. Yi, *Acta Polym. Sin.* 2 (2001) 215.
- [30] K. Sutani, I. Kaetsu, K. Uchida, *Radiat. Phys. Chem.* 64 (2002) 331.
- [31] B.J. Rubio Retama, E.J. López-Cabarcos, B. López-Ruiz, *Talanta* 68 (2005) 99.
- [32] J.P. Hervás Pérez, E.J. López-Cabarcos, B. López-Ruiz, *Talanta* 75 (2008) 1151.
- [33] M. Sánchez-Paniagua López, D. Mecerreyes, E. López-Cabarcos, B. López-Ruiz, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2006) 2320.
- [34] B.J. Rubio Retama, B. López-Ruiz, E.J. López-Cabarcos, *Biomaterials* 24 (2003) 2965.
- [35] L. Ying, E.T. Kang, K.G. Neoh, *J. Membr. Sci.* 208 (2002) 361.
- [36] M.A. Abdel-Naby, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38 (1993) 69.
- [37] S.A. Cetinus, H.N. Oztup, *Enzyme Microb. Technol.* 32 (2003) 889.
- [38] S. Cosnier, S. Szunerits, R.S. Marks, A. Novoa, L. Puech, E. Perez, I. Rico-Lattes, *Talanta* 55 (2001) 889.
- [39] J.P. Hervás Pérez, M. Sánchez-Paniagua López, E. López-Cabarcos, B. López-Ruiz, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2006) 429.
- [40] M. Sánchez-Paniagua López, J.P. Hervás Pérez, E. López-Cabarcos, B. López-Ruiz, *Electroanalysis* 19 (2007) 370.
- [41] D. Shan, M. Zhu, H. Xue, S. Cosnier, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 1612.
- [42] W. Horwitz, *Anal. Chem.* 54 (1982) 67.
- [43] S.A. Miscordia, J. Desbrieres, G.D. Barrera, P. Labbé, G.A. Rivas, *Anal. Chim. Acta* 578 (2006) 137.
- [44] X. Chu, D. Duan, G. Shen, R. Yu, *Talanta* 71 (2007) 2040.
- [45] B.Y. Wu, S.H. Hou, F. Yin, Z.X. Zhao, Y.Y. Wang, X.S. Wang, Q. Chen, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 2854.
- [46] L. Wu, X. Zhang, H. Ju, *Biosens. Bioelectron.* 23 (2007) 479.
- [47] D.S. Young, *Effects of Drug on Clinical Laboratory Test*, 3rd edition, AACC Press, Washington, 1990.

5

DISCUSIÓN

5.1. Microgeles de PAAm como sistema de inmovilización enzimática. Preparación y caracterización de los microgeles de PAAm.

La síntesis de microgeles de poliacrilamida se ha realizado mediante el método de polimerización por emulsión concentrada, tal y como se describe en el apartado 3.3.1, variando el grado de reticulación según la enzima utilizada.

Un factor muy importante a considerar en la encapsulación de un enzima en el interior de una matriz polimérica, es la porosidad que presenta dicha matriz, para impedir la salida del enzima al exterior y permitir la entrada del sustrato. En la Tabla 3.1. anteriormente mostrada, se detalló la composición de las fases precursoras de la emulsión de poliacrilamida utilizada en la encapsulación de las distintas enzimas para cada grado de reticulación. El control del tamaño de poro de la red se consigue mediante el control del agente reticulante utilizado en la síntesis. Si se utilizan concentraciones bajas de agente reticulante, la enzima retenida en la matriz polimérica se pierde durante el proceso de lavado y centrifugado de la misma, como se pone de manifiesto por la actividad enzimática observada en el sobrenadante. Sin embargo, para concentraciones altas de agente reticulante, el tamaño de poro se hace demasiado pequeño, manifestándose en una disminución de la respuesta obtenida, que se atribuye a la dificultad de difusión del sustrato hasta el centro activo de la enzima encapsulada debida a la densidad de la matriz polimérica.

La concentración óptima de agente reticulante depende del peso molecular de la enzima y es un parámetro importante que debe ser calculado en cada caso. En la Tabla 5.1. se muestra la detección de la actividad enzimática en el sobrenadante obtenido de la síntesis para cada grado de reticulación dependiendo de la enzima utilizada. La actividad del sobrenadante se midió amperométricamente utilizando una celda termostatzada con tres electrodos y añadiendo distintas concentraciones de los sustratos dependiendo de la enzima:

Así para GlOx, 5 ml del líquido sobrenadante obtenido de la síntesis de las micropartículas se depositaron en la celda termostatzada a 25 °C y se añadió una concentración 0.1M de

galactosa, midiéndose a un potencial de + 0,7V vs. ECS. Para ChOx se añadió una concentración 8 mM de colina, midiéndose a un potencial de + 0,6V vs. ECS. Para AChE se añadió una concentración 1,5 M de acetilcolina, midiéndose a un potencial de + 0,6V vs. ECS. Para PPO se añadió una concentración 200 μ M de catecol, midiéndose a un potencial de – 0,1V vs. ECS a 20 °C.

En la tabla se puede observar como para cada micropartícula, hay un grado de entrecruzamiento mínimo a partir del cual no se observa pérdida de la enzima, difiere en cada caso en función del peso molecular de la enzima inmovilizada. A mayor peso molecular, menor cantidad de agente reticulante es necesario para mantener la enzima inmovilizada en las micropartículas.

Enzima	η (%)	Actividad del Sobrenadante
GlOx <i>Pm: 72.000Da</i>	6,0	SI
	6,5	SI
	7,0	NO
	7,5	NO
	8,0	NO
ChOx <i>Pm: 78.000Da</i>	5,0	SI
	6,0	SI
	6,5	SI
	7,0	NO
	7,5	NO
	8,0	NO
ChOx / AChE <i>Pm: 45.000Da</i>	7,0	NO
PPO <i>Pm: 128.000Da</i>	1,6	SI
	2,5	SI
	3,5	SI
	4,0	NO
	4,5	NO
	5,0	NO

Tabla 5.1.: Detección de la actividad enzimática en el líquido sobrenadante.

Debido a la especial síntesis requerida para inmovilizar adecuadamente ChOX y AChE en las micropartículas de PAAm, debido a la diferencia en sus pesos moleculares, sólo se realizó la síntesis de las micropartículas partiendo del grado óptimo de reticulación de la enzima ChOx, por lo que no se observa actividad en este sobrenadante.

Con el fin de conocer cómo afecta la reacción de polimerización a la actividad enzimática, esta se midió para micropartículas que presentan la enzima inmovilizada, midiéndose también la actividad enzimática de la misma cantidad de enzima libre utilizada en la síntesis. Para medir la actividad de la ChOx se compararon las absorbancias obtenidas de las hidrólisis del sustrato acetiltiocolina (ATCh) por la enzima colinesterasa por espectrofotometría a 412 nm. La absorbancia será proporcional a la cantidad de colina. Se encontró que la actividad enzimática de la dispersión de micropartículas fue un 79% de la actividad enzimática de la disolución de enzima.

Para medir la actividad de la PPO se compararon las absorbancias obtenidas de las o-quinonas producidas enzimáticamente. Se encontró que la actividad enzimática de la dispersión de micropartículas fue un 74% de la actividad enzimática de la disolución de enzima.

A la vista de los resultados obtenidos, el método de inmovilización propuesto supone una pérdida de la actividad enzimática en el intervalo del 21 – 26 %.

Un factor clave a la hora de inmovilizar enzimas bajo esta modalidad de inmovilización, es la temperatura a la cual se realiza la polimerización. Como la reacción de polimerización es exotérmica, se produce liberación de calor con el consiguiente aumento de temperatura en el medio de reacción. La temperatura alcanzada depende de la cantidad de agente iniciador utilizado en la síntesis. Para la enzima GLOx, debido a que su temperatura de desnaturalización se encontraba en torno a 30°C, no se realizó el estudio de la temperatura de polimerización durante la síntesis, ya que se tomaron como modelo para estas síntesis los datos del estudio realizado para la enzima GOx¹³², en el que se explica que la finalización de la síntesis

debe producirse cuando se alcanza la temperatura de 30°C, temperatura máxima para preservar la enzima no desnaturalizada.

Para estudiar cómo afecta la concentración de agente iniciador en el tiempo de polimerización, las concentraciones de persulfato de amonio estudiadas cuando se utiliza la GLOx fueron 9,86; 10,96; 13,15 y 21,92mM, obteniéndose mejores resultados al utilizar una concentración de 13,15mM, puesto que el tiempo de polimerización necesario para obtener una eficacia de polimerización próxima al 100 % resultó ser de 60 min, tiempo necesario para realizar la síntesis¹³².

Cuando se realizó la síntesis de las otras enzimas (ChOx, PPO, ChOx/ACHe), se observó que la concentración óptima de PSA para realizar la síntesis sin que se produzca una elevación de temperatura perjudicial para la enzima, es de 10,96mM. Al disminuir la concentración de PSA se requiere un tiempo mayor para alcanzar un porcentaje de polimerización próximo al 100 %, siendo en este caso de 90 minutos, pero se permite mantener a la enzima sin que sufra desnaturalización.

El estudio morfológico de las micropartículas se ha realizado mediante microscopía electrónica de barrido. En la Figura 5.1 (a) se muestra la micrografía obtenida con micropartículas de poliacrilamida vacías, es decir sin enzima inmovilizada en su interior, con un grado de reticulación de 4,0%. En la Figura 5.1 (b) se muestra la micrografía de micropartículas de poliacrilamida de grado de reticulación 7,0%, con GLOx en su interior. En la Figura 5.1 (c) se muestra la micrografía de micropartículas de poliacrilamida con ChOx encapsulada en su interior para un grado de reticulación de 7,0%. Mientras que la Figura 5.1 (d) presenta la micrografía de las micropartículas de PAAM con ChOx / AChE inmovilizada en su interior para un grado de reticulación del 7,0%, y la Figura 5.1 (e) las micropartículas de PAAM con PPO inmovilizada en su interior para un grado de reticulación de 4,0%.

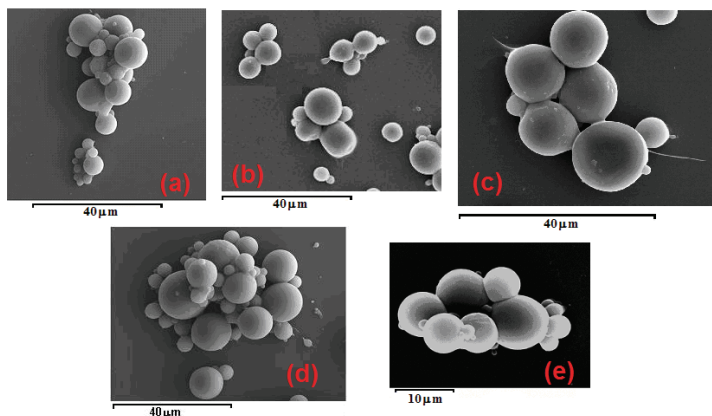


Figura 5.1.: Micrografías de micropartículas de PAAm sin enzima (a) y con las diferentes enzimas en su interior: con GlOx (b), con ChOx (c), con ChOx / AChE (d), con PPO (e).

En todos los casos, tal y como se observa en las micrografías obtenidas por SEM tanto con las enzimas en su interior como sin ella, la forma de las micropartículas es esférica, pudiéndose observar además la polidispersidad de las micropartículas.

En la Tabla 5.2. se muestra un resumen de los datos obtenidos, mediante un analizador de tamaños Galai-Cis 1, con las micropartículas de PAAm con las distintas enzimas inmovilizadas en su interior para distintos grados de reticulación según la enzima inmovilizada. El tamaño promedio de las micropartículas disminuye cuando éstas contienen enzima, debido a que utilizamos un contenido de agente entrecruzante mayor para poder así retener a la proteína.

Enzima	η (%)	\bar{X} (μm)
PAAm vacías	4,0	5,0
GlOx	7,0	4,8
ChOx	7,0	4,6
ChOx / AChE	7,0	3,8
PPO	4,0	5,2

Tabla 5.2.: Relación de medias de tamaños de las distintas micropartículas de PAAm con y sin enzima.

La Figura 5.2. representa la gráfica de distribución de tamaños obtenida para las distintas micropartículas, observándose que la mayor población (el 70% en todas ellas), se encuentra para partículas de tamaño medio entre 2 y 5 micras.

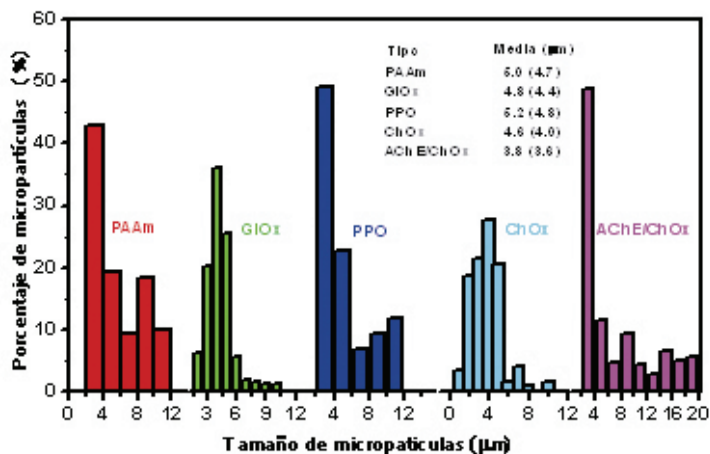


Figura 5.2.: Gráfica de distribución de distribución de tamaños para micropartículas de poliacrilamida vacías o con las distintas enzimas, en tampón fosfato pH 6,0.

La concentración de agente reticulante afecta no sólo al del tamaño de poro y al tamaño de la partícula, sino también a otras propiedades del polímero, como la temperatura de transición vítrea (T_g). La T_g , es un parámetro importante en la caracterización de los polímeros, ya que está relacionada con la rigidez del polímero y por ello se puede ver influida por factores que modifican la estructura del mismo, tales como la concentración de agente reticulante, presencia de agua y atrapamiento de enzimas en su interior. Con el fin de definir claramente la T_g en los registros calorimétricos, es necesario desecar previamente las muestras. Para lo cual se calentaron durante 10 minutos a 150°C, consiguiéndose así la eliminación total del agua.

Además el contenido de agente entrecruzante de las micropartículas estudiadas se varió alrededor del valor óptimo requerido para la inmovilización de la cada una de las diferentes enzimas utilizadas (Figura 5.3).

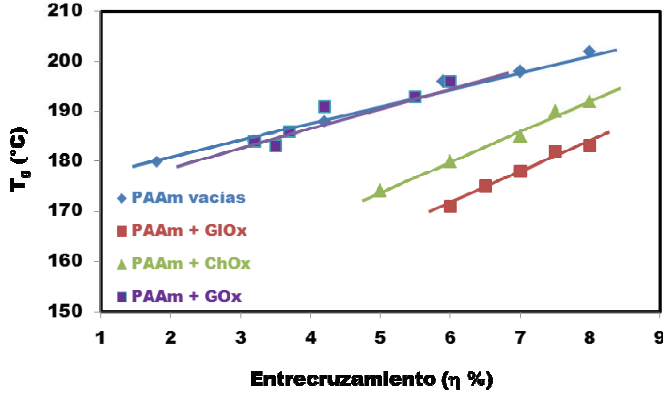


Figura 5.3.: Variación de la temperatura de transición vítrea para las micropartículas de PAAm con y sin enzima

La dependencia de la T_g con el grado de reticulación se puede expresar mediante la ecuación:

$$\frac{T_g - T_0}{T_0} = \frac{\frac{KM\eta}{\gamma}}{\left(1 - \frac{KM\eta}{\gamma}\right)} \quad [22]$$

Donde T_g es la temperatura de transición vítrea del polímero, T_0 es la temperatura de transición vítrea del polímero sin agente reticulante, K es una constante independiente del polímero cuyo valor es aproximado a 1.3×10^{23} , M es la masa molecular del monómero, η es la concentración de agente reticulante y γ hace referencia al número de enlaces flexibles por unidad monomérica. Esta ecuación se puede simplificar en la ecuación [23], cuando se emplean pequeñas cantidades de agente reticulante.

$$T_g = T_0 + K\eta \quad [23]$$

Esta ecuación prevé un aumento de la T_g del polímero con el contenido de agente reticulante, consecuencia directa del aumento de la rigidez del polímero. En la Tabla 5.3 se observa que al comparar las micropartículas con enzima

inmovilizada se observa un aumento de Tg al aumentar el grado de reticulación, excepto en el caso de la inmovilización del a ChOx.

Enzima	η (%)	Tg ($^{\circ}\text{C}$)
Vacías	4,0	$181,9 (^{\circ}\text{C}) + 3,9 \eta$ (%)
GOx	3,2	$173,8 (^{\circ}\text{C}) + 3,73 \eta$ (%)
PPO	4,0	$174,0 (^{\circ}\text{C}) + 3,7 \eta$ (%)
ChOx	7,0	$169,0 (^{\circ}\text{C}) + 15,0 \eta$ (%)
GlOx	7,0	$179,0 (^{\circ}\text{C}) + 14,3 \eta$ (%)

Tabla 5.3.: Dependencia de la Tg para cada una de las distintas micropartículas sintetizadas tanto sin como con enzima en su interior.

Como muestra la Figura 5.3., las micropartículas vacías presentan una Tg superior a las que poseen las micropartículas con enzima. Como dato significativo cabe resaltar que las ecuaciones para las micropartículas con las enzimas GlOx y ChOx inmovilizadas, presentan unos valores de la pendiente (K) por encima de las demás micropartículas con enzimas, que podría deberse al aumento en la concentración de agente entrecruzante empleados. También hay que destacar la linealidad que presentan todas las rectas de Tg. La diferencia existente entre la temperatura de transición vítrea para micropartículas con las distintas enzimas y las micropartículas vacías, se atribuye a la presencia de la enzima, que produce un efecto plastificante en el microgel¹⁵⁶ disminuyendo el valor de la Tg.

La caracterización estructural de todas las micropartículas se ha realizado por difracción de rayos X barriendo la región angular comprendida entre $2\theta=5^{\circ}$ y $2\theta=40^{\circ}$, para micropartículas vacías, así como con las distintas enzimas en su interior. Además se ha realizado un difractograma de cada una de las enzimas libre.

En el difractograma de las micropartículas con GlOx, se observa un máximo ancho característico de estructuras

¹⁵⁶ B.J. Rubio Retama, E.J. López-Cabarcos, B. López-Ruiz, Biomaterials. 24, 2965-2973 (2003)

amorfos y que aparece en este caso centrado alrededor de la posición $2\theta_1 = 21,16$ grados (Figura 5.4.a). Aparece un pequeño pico en la posición $2\theta_2 = 31,56$ grados que podría atribuirse a la enzima (Figura 5.4.b). El espaciado d correspondiente a estas reflexiones es $d_1 = 4,40$ Å y $d_2 = 2,98$ Å.

No se observa ningún cambio de los espaciados al variar el contenido de agente entrecruzante. El espaciado d_1 parece corresponde con una distancia entre cadenas poliméricas. Por el contrario, el espaciado d_2 no se observa en microgeles sin enzima, por lo que pensamos debe estar relacionado con la presencia de galactosa oxidasa dentro del microgel y se corresponde con alguna característica estructural de la enzima.

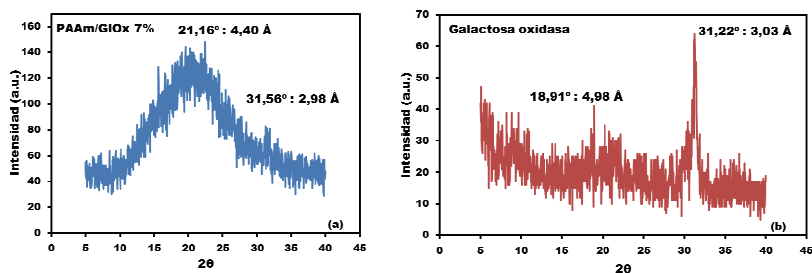


Figura 5.4.: Difractograma de rayos X de microgeles de PAAm $\eta = 7,0\%$ con GlOx (a), y de GlOx sin inmovilizar (b).

La Figura 5.5.(a) muestra los difractogramas obtenidos con micropartículas de PAAm al 4,0%, con PPO y a la enzima PPO libre, observando una estructura amorfa con 2 halos con un máximo en $2\theta_1 = 21,26$ grados y $2\theta_2 = 31,96$ grados, correspondiendo el espaciado d de estas reflexiones a $4,42$ Å y $2,98$ Å respectivamente. Datos similares obtenidos a los difractogramas con micropartículas de PAAm y enzima GlOx. Además, en los microgeles con enzima aparece un pico a $2\theta = 32$ grados (distancia $2,98$ Å) que está relacionado con la presencia de PPO dentro del gel, observándose un pico a esa misma distancia en el caso del difractograma de la enzima sola (Figura 5.5.b).

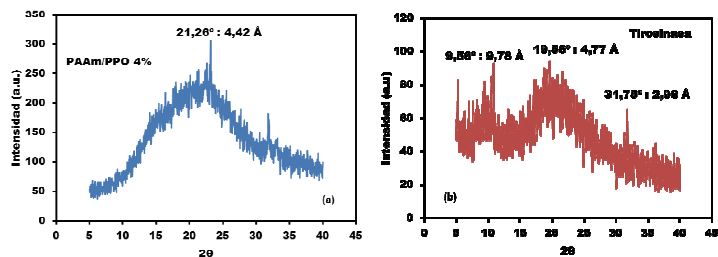


Figura 5.5.: Difractogramas de rayos X de microgeles de PAAm $\eta = 4\%$ con PPO (a) y de PPO sin inmovilizar (b).

La Figura 5.6.a muestra los difractogramas obtenidos con micropartículas de PAAm al 7.0%, con y sin ChOx, observando una estructura amorfa en ambos espectros con 2 halos con un máximo en $2\theta_1=21.12$ grados y $2\theta_2=37.43$ grados. No se observa ninguna dependencia clara de los espaciados con el contenido de entrecruzante. Las pequeñas fluctuaciones en d_1 y d_2 entre las micropartículas a los distintos grados de reticulación se atribuyen a las heterogeneidades que se forman dentro de los microgeles durante el proceso de polimerización y son difíciles de reproducir.

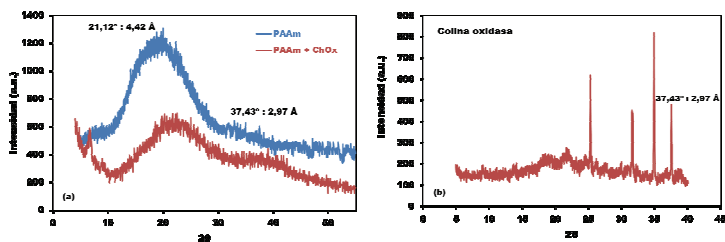


Figura 5.6.: Difractograma de rayos X de microgeles de PAAm $\eta = 7\%$ con y sin ChOx (a) y difractograma de ChOx sin inmovilizar (b).

El espaciado d correspondiente a estas reflexiones es $d_1=4.19\text{\AA}$ y $d_2=2.39\text{\AA}$. El espaciado d_1 aparece en microgeles de PAAm sin enzima⁹² donde se ha medido el valor $d_1=4.15\text{\AA}$ y también se ha observado que al calentar el microgel aumenta hasta 4.42\AA lo que parece indicar que se corresponde con una distancia entre cadenas poliméricas. Por el contrario el espaciado d_2 no se observa en microgeles sin enzima y por eso pensamos que debe estar relacionado con la presencia de colina oxidasa dentro del gel y se

corresponde con alguna característica estructural de la enzima. Al igual que ocurría con las micropartículas de GlOx y de PPO, se observa en la Figura 5.6.a un pico característico del difractograma de la enzima que presenta un máximo en $2\theta=37,43$ grados, que se muestra en la Figura 5.6.b.

La Figura 5.7. muestra los difractogramas obtenidos con micropartículas de PAAm y 7,0%, con las dos enzimas inmovilizadas, ChOx y AChE, observando una estructura amorfa en el espectro, presentando un halo con un máximo en $2\theta=21,12$ grados. Al igual que en la inmovilización de ChOx solamente, se observa un de los picos característicos de la estructura de la enzima que se sitúa en $2\theta=31,96$ grados (Figura 5.7.).

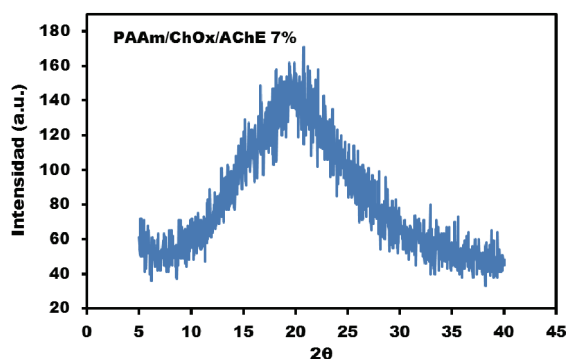


Figura 5.7.: Difractograma de rayos X de microgeles de PAAm $\eta = 7,0\%$ con ChOx y AChE

Se observa en todos los difractogramas la estructura amorfa típica de la PAAm y diversos picos dependiendo de la enzima que se asocia con la estructura de la misma. Este resultado se explica teniendo en cuenta que la inmovilización de las diferentes enzimas utilizadas se lleva a cabo en un medio oleoso, donde están disueltas las cadenas del polímero, y en el que la enzima está dispersada en forma de cristales de pequeño tamaño, los cuales pasan a formar parte de las gotículas de la fase interna de esta emulsión, y que hace que la red sintetizada permita que el haz llegue a la estructura tridimensional de la enzima.

5.2. Respuesta de los distintos biosensores de PAAm

5.2.1. Biosensor para la determinación de galactosa preparado con microgeles de PAAm con galactosa oxidasa

El fundamento electroquímico utilizado en el biosensor de galactosa se basa en el esquema siguiente: la galactosa al reaccionar con la galactosa oxidasa genera peróxido de hidrógeno que se oxida en el electrodo, a un potencial de +0,7 V vs ECS dando lugar a una corriente eléctrica que es proporcional a la concentración de galactosa en la disolución.



Una vez optimizadas las distintas variables experimentales que afectan a la respuesta del biosensor tales como la influencia del grado de reticulación de las micropartículas poliméricas, la carga enzimática, el potencial de trabajo, el estudio de la influencia del pH, el estudio del efecto de la temperatura, se realizó una curva de calibrado en condiciones óptimas (Figura 5.8.), obteniéndose una sensibilidad para la determinación de galactosa de $21 \text{ nA mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$, con un intervalo lineal de $9 \cdot 10^{-4} - 8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, y un límite de detección de $7,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, consiguiendo una medida de la concentración de galactosa en un tiempo de respuesta de 60 segundos.

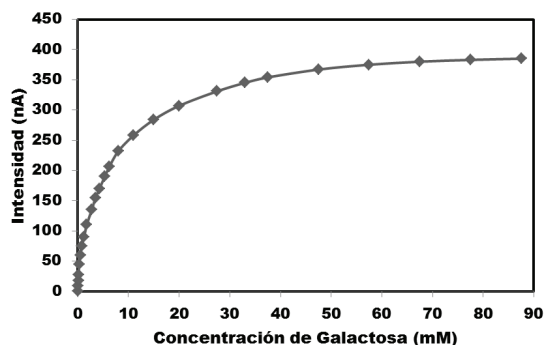


Figura 5.8.: Curva de calibrado obtenida con el biosensor de galactosa con micropartículas de PAAm en condiciones experimentales óptimas

Comparando las aportaciones del biosensor propuesto en este trabajo con una muestra representativa de los biosensores de galactosa oxidasa utilizados, publicados a lo largo de estos últimos años, la sensibilidad, el rango de linealidad y el límite de detección obtenido, se sitúa en valores medios con respecto a los encontrados en la literatura. En la Tabla 5.4 se muestran las características de estos biosensores, mencionando el sistema de inmovilización utilizado, así como las propiedades analíticas y el tiempo de vida de cada uno.

El biosensor propuesto utilizando la inmovilización de la GlOx en micropartículas, presenta unas características similares a los demás biosensores ya publicados, sin embargo presenta dos ventajas que les hace interesante: i) la gran estabilidad del material biológico (mínima de 1 año), ii) la fácil preparación del biosensor (una vez preparados los microgeles con enzima se puede disponer en muy poco tiempo de un nuevo biosensor).

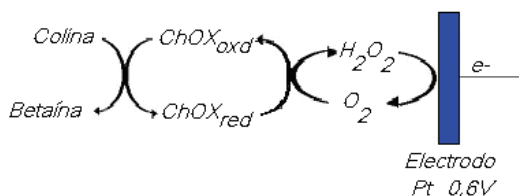
Ref.	Sistema de inmovilización	Sensibilidad (nA mM ⁻¹ cm ⁻²)	Rango lineal (mM)	Límite de detección	K_m^{app} (mM)	Tiempo de respuesta (seg)	Tiempo de vida (días)
Este trabajo	Micropartículas	21	9 – 80	7,5 10 ⁻⁴ M	4,82	60	365
157	Electropolimerización	106	0 – 24	-	43 ± 4	40	-
158	Inmovilización covalente	175	2 – 16	25 µM	14,7	5	10
159	Inmovilización covalente	23	2 – 20	0,1 mM	-	5	30
160	Electropolimerización	15	2 – 20	-	16	4	30
161	Electropolimerización	450	1 – 40	-	21,7	30	3
162	Electropolimerización	106	0 – 24	-	-	40	-

Tabla 5.4.: Características de biosensores de galactosa oxidasa propuestos en la literatura

157 W.J. Sung, Y.H.Bae, *Sensors and Actuators B*, **114** 164 (2006)
158 M.Şenel, I. Bozgeyik, E. Çevik, M.F. Abasiyanik, *Synthetic Metals*, **160** 440 (2011)
159 E. Çevik, M. Şenel, *Current Applied Physics*, **10** (5) 1313 (2010)
160 E. Ekinci, A. Pasahan, *European Polymer Journal*, **40** 1605 (2004)
161 H. Gulce, I. Ataman, A. Gülce, A. Yildiz, *Enzyme Microbiological Technology*, **30** 41 (2002)
162 W.J. Sung, Y.H. Bae, *Sensors and Actuators B*, **114** 164 (2006)

5.2.2. Biosensores para la determinación de colina, acetilcolina y nicotina preparados con microgeles de PAAm con colina oxidasa y colina oxidasa/acetilcolinesterasa

La medida electroquímica utilizada en el biosensor de colina se basa en el esquema siguiente: la colina al reaccionar con la colina oxidasa genera peróxido de hidrógeno que se oxida en el electrodo, a un potencial de +0,6 V vs ECS dando lugar a una corriente eléctrica que es proporcional a la concentración de galactosa en la disolución.



Una vez optimizadas las distintas variables experimentales que afectan a la respuesta del biosensor, se realizó una curva de calibrado en condiciones óptimas (Figura 5.9), obteniéndose una sensibilidad para la determinación de colinaa de $17,45 \text{ nA mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$, con un intervalo lineal de $2 \cdot 10^{-5}$ – $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, y un límite de detección de $8 \mu\text{M}$, consiguiendo una medida de la concentración de colina en un tiempo de respuesta de 90 segundos. Los coeficientes de variación obtenidos para la repetibilidad y para la precisión para una concentración de colina de $0,01 \text{ mM}$ fueron 5,24 y 7,75% respectivamente. Al comparar los resultados obtenidos con los CV máximos aceptados por Hortwithz según la concentración de analito, (ver Tabla 3.2), se encuentra por debajo de los aceptables, lo que demuestran la buena precisión de las señales amperométricas obtenidas con el biosensor monoenzimático formado por micropartículas de poli(acrilamida) en la determinación de colina.

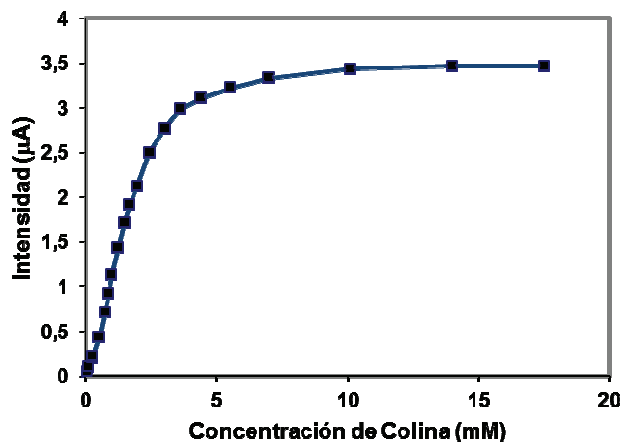


Figura 5.9.: Curva de calibrado obtenida con el biosensor de colina con micropartículas de PAAm en condiciones experimentales óptimas

Se ha comparado las aportaciones del biosensor propuesto en este trabajo con una muestra representativa de los biosensores de colina oxidasa publicados a lo largo de estos últimos años. En la Tabla 5.5 se muestran las características de estos biosensores, mencionando el sistema de inmovilización utilizado, así como las propiedades analíticas y el tiempo de vida de cada uno. La sensibilidad, el rango de linealidad y el límite de detección obtenidos con el biosensor de colina, se sitúa en valores medios con respecto a los encontrados en la literatura, destacando el tiempo de vida que se obtiene con las micropartículas como sistema de inmovilización, aumentando en más de 300 días con respecto al mejor de los biosensores mostrados.

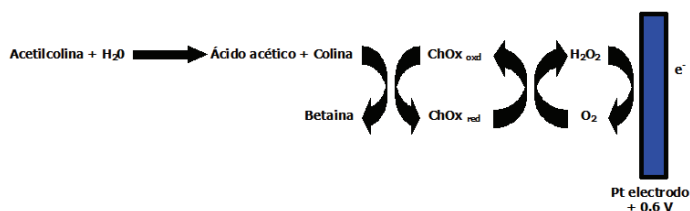
Ref.	Sistema de inmovilización	Sensibilidad	Rango lineal (M)	Límite de detección (μM)	K_m^{app} (mM)	Tiempo de respuesta (seg)	Tiempo de vida (días)
Este trabajo							
	Micropartículas	17,45 μA mM ⁻¹ cm ⁻²	2 · 10 ⁻⁵ – 2,0 · 10 ⁻⁴	8,0	1,44	60	365
163	Fotopolimerización	22 mA Lmol ⁻¹	> 1,0 · 10 ⁻⁴	2,5 · 10 ³	ND	30	ND
164	Fotopolimerización	22 mA Lmol ⁻¹	> 1,0 · 10 ⁻⁴	2,5 · 10 ³	ND	30	ND
165	Sílica Sol-Gel	ND	> 1,6 · 10 ⁻³	5,0 · 10 ⁻²	ND	10	30
166	Sílica Sol-Gel	ND	5 · 10 ⁻⁶ – 1,0 · 10 ⁻⁴	7,0 · 10 ¹	ND	15	10
167	Chitosan	ND	4 · 10 ⁻⁷ – 1,3 · 10 ⁻⁴	ND	0,9	ND	23
168	Agarosa	ND	8 · 10 ⁻⁷ – 1,3 · 10 ⁻⁴	ND	0,9	ND	ND
169	Crosslinking	ND	5 · 10 ⁻⁷ – 7,0 · 10 ⁻⁵	1,0 · 10 ²	ND	75	ND
170	Deposición capa-cap	14,7 μA mM ⁻¹ cm ⁻²	5 · 10 ⁻⁷ – 1,0 · 10 ⁻⁴	1,0 · 10 ⁻²	0,83	10	ND

Tabla 5.5.: Características de biosensores de colina oxidasa propuestos en la literatura

163
164
165
166
167
168
169
170

B. Leca, R. Morelis, P. Coulet, *Sensors and Actuators B*, **27** 436 (1995)
B. Leca, R. Morelis, P. Coulet, *Mikrochim Acta*, **121** 147 (1995)
M. Yang, Y. Yang, Y. Yang, G. Shen, R. Yu, *Anal Chim Acta*, **530** 205 (2005)
Z. Song, J. Huang, B. Shi, J. Anzai, *Sensors and Actuators B*, **115** 626 (2006)
A. Sassolas, L.J. Blum, B.D. Leca-Bouvier, *Anal Bioanal Chem.*, **394** 971 (2009)
A. Sassolas, L.J. Blum, B.D. Leca-Bouvier, *Sensors and Actuators B*, **139** 214 (2009)
S. Serradilla, S. Pochet, K. Grosfils, J.M. Kauffman, *Biosensors and Bioelectronics*, **18** 185 (2003)
H. Shi, Y. Huang, J. Zhao, X. Xu, J.-I. Anzai, *Talanta*, **70** 852 (2006)

Utilizando como base la inmovilización enzimática en estos microgeles, se propuso la inmovilización de una segunda enzima, AChE junto con ChOx. La elección de la reticulación determina el tamaño del poro de las micropartículas y parece que el óptimo de reticulación depende del peso molecular de la enzima inmovilizada, por lo que a pesar de que el tamaño de reticulación dependería de la enzima de menor tamaño, en este caso AChE, se optó por el grado de reticulación óptimo para la ChOx, para mantener así la misma sensibilidad que con el biosensor monoenzimático, y poder realizar estudios comparativos entre ambos biosensores. El método de síntesis tuvo que variarse debido a la falta de señal obtenida, puesto que se utilizaba un grado de reticulación demasiado pequeño para atrapar a la enzima AChE. Para paliar este efecto, antes de la incorporación de las enzimas de la fase dispersa de la emulsión, una solución de AChE se mantuvo durante 5 minutos en contacto con vapor de glutaraldehído, para conseguir una unión covalente entre las moléculas de la enzima y para evitar así su pérdida. En este caso el biosensor preparado dio señal a la acetilcolina y colina, sin embargo la sensibilidad para colina fue de alrededor de un 35% inferior a la señal generada por el biosensor monoenzimático, valor mayor de pérdida de sensibilidad cuando se compara la señal del biosensor monoenzimático en la determinación de acetilcolina con la del biosensor monoenzimático. Estos resultados se deben al método de inmovilización necesario para ambas enzimas, en el que debido a la utilización de glutaraldehído, provoca la disminución de la señal generada por el biosensor bienzimático en relación a la señal del biosensor monoenzimático. Además de la disminución en la señal generada por el biosensor bienzimático, se produce un aumento del tiempo de respuesta, que también se atribuye a la metodología empleada en la síntesis de este biosensor. La medida electroquímica utilizada en el biosensor bienzimático, se basa en el esquema siguiente.



Al igual que en anteriores ocasiones, una vez optimizadas las distintas variables experimentales que afectan a la respuesta del biosensor bienzimático, se realizó la curva de calibrado (Figura 5.10.), obteniéndose una sensibilidad para la determinación de acetilcolina de 0,98 nA mM⁻¹ cm⁻², con un intervalo lineal de 7,5 10⁻⁴ – 1,84 10⁻² M, y un límite de detección de 7,45 μM, consiguiendo una medida de la concentración de acetilcolina en un tiempo de respuesta de 120 segundos. Los coeficientes de variación obtenidos para la repetibilidad y para la precisión para una concentración de acetilcolina de 0,01 mM fueron 5,56 y 7,96% respectivamente. Al comparar los resultados obtenidos con los CV máximos aceptados por Hortwithz según la concentración de analito, (ver Tabla 3.2), se encuentra por debajo de los aceptables, lo que demuestran la buena precisión de las señales amperométricas obtenidas con el biosensor bienzimático formado por micropartículas de poliácridamida en la determinación de acetilcolina.

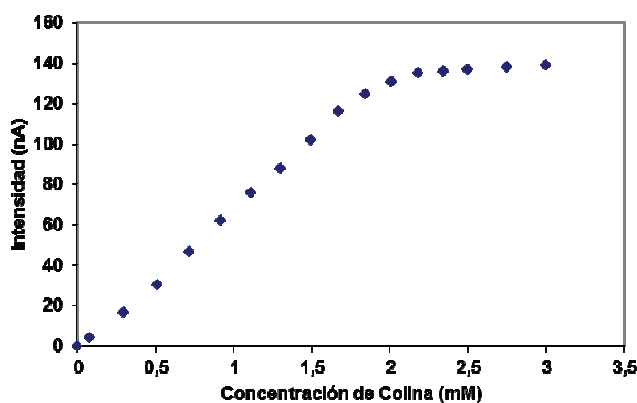


Figura 5.10.: Curva de calibrado obtenida con el biosensor de colina con micropartículas de PAAM con AChE-ChOx en condiciones experimentales óptimas.

Los resultados anteriores confirman la posibilidad de estos microgeles para inmovilizar más de una enzima. Después de 90 días, el biosensor bienzimático retenía el 93% de su sensibilidad inicial. Al contrario que en anteriores inmovilizaciones, esta variación en el método de inmovilización provoca una disminución en la estabilidad del sistema.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el biosensor de colina y con el fin de amplificar la aplicación analítica de los biosensores basados en microgeles como sistemas de inmovilización, se procedió al estudio de la determinación de uno de los inhibidores de la enzima ChOx, la nicotina. La determinación de la nicotina se puede llevar a cabo mediante la medición de la disminución que la corriente generada por la colina sufre cuando la nicotina se añade a la solución. Tanto el biosensor monoenzimático, es decir con ChOx inmovilizada, como el biosensor bienzimático (con ChOx y AChE inmovilizadas), se comprobaron con este propósito. En las Figuras 5.11a, 5.11b se puede observar la inhibición reversible que causa la nicotina en ChOx en ambos biosensores. Estos resultados indican que el principio de inhibición se puede utilizar para determinar la nicotina (en concentración 0,01M), utilizando los dos biosensores amperométricos.

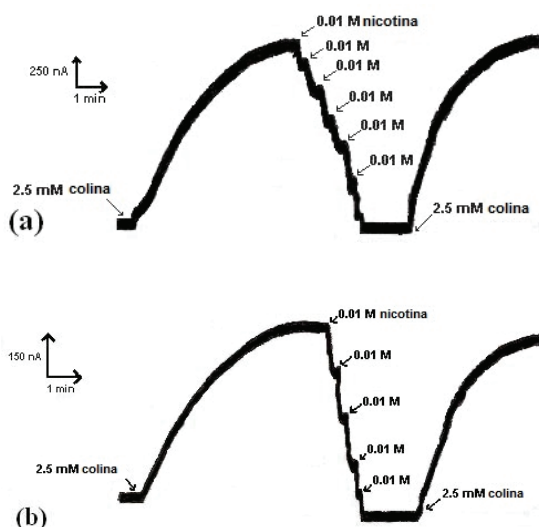


Figura 5.11. Reversibilidad de la inhibición de nicotina a colina oxidasa: a) biosensor de ChOx; b) biosensor de ChOx/AChE.

5.3. Microgeles de poli(ácido metacrílico). Biosensor para la determinación de glucosa preparado con microgeles de poli(ácido metacrílico) con glucosa oxidasa

Previo a la realización de la discusión y comparación de todos los polímeros de metacrilatos estudiados (p-PEGMEM, p-DMAEM y p-AMA), se muestran en este apartado los resultados obtenidos con p-AMA dado que no están aún publicados.

Los copolímeros del ácido metacrílico y diferentes ésteres acrílicos o metacrílicos de interés farmacéutico son particularmente atractivos como consecuencia de su elevada estabilidad química y de su compatibilidad con diferentes materiales. Estos polímeros son biocompatibles y farmacológicamente inertes. Elegimos el poli(ácido metacrílico) (p-AMA) como sistema de inmovilización porque presenta las dos características previamente estudiadas en los polímeros derivados del metacrilato, la dependencia en el pH y en la temperatura.

Se ha investigado la inmovilización de GOx en matrices de p-AMA con el objetivo de comparar los resultados obtenidos entre este biosensor y los publicados por nuestro grupo con diferentes polímeros utilizados como sistema de inmovilización, además de comprobar si la dependencia simultánea del polímero al pH y a la temperatura afecta a la respuesta del biosensor.

Para estudiar la respuesta de los microgeles a los cambios de temperatura se hizo un estudio desde temperaturas por debajo de la LCST hasta temperaturas superiores a la LCST.

Con el fin de poder estudiar todas las posibles interacciones entre la enzima y el polímero, se varió el pH del medio desde pHs inferiores al pKa hasta valores superiores al mismo.

Debido a que estos resultados se encuentran en fase de publicación, esta parte de la tesis, se describen de forma similar a una publicación.

5.3.1. Control de la síntesis

Un factor clave en la inmovilización de enzimas es la temperatura a la cual se realiza la polimerización. Como la reacción de polimerización es exotérmica, se produce liberación de calor con el consiguiente aumento de temperatura en el medio de reacción. La temperatura alcanzada depende de la cantidad de agente iniciador utilizado en la síntesis. Por esta razón, se realizaron los estudios de la temperatura de polimerización y del porcentaje de polimerización a lo largo del tiempo en la síntesis de micropartículas de p-AMA con GOx inmovilizada. Se realizaron distintas síntesis de micropartículas variando la cantidad de agente iniciador.

En la Figura 5.12. se muestra la evolución de la temperatura con el paso del tiempo para distintas cantidades de agente iniciador. Para evitar la desnaturalización de la enzima y observando que para una concentración del agente iniciador de 10,86 mM, la temperatura de polimerización no supera los 21°C y el tiempo necesario para llevarse a cabo el 95% de la polimerización se sitúa en torno a 90 minutos (Figura 5.13.). Se decide utilizar esta concentración de agente iniciador para posteriores síntesis.

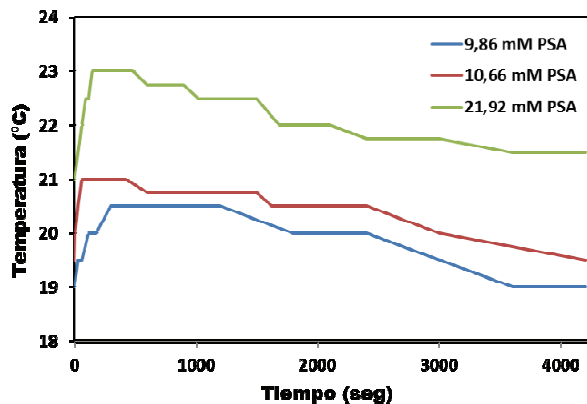


Figura 5.12.: Evaluación de la temperatura de polimerización con respecto al tiempo para distintas cantidades de agente iniciador

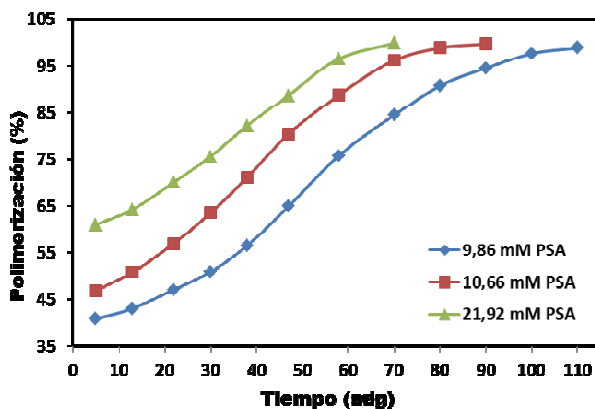


Figura 5.13.: Grado de conversión del monómero en función del tiempo para distintas concentraciones de agente iniciador

Para comprobar además cómo afectaba la temperatura a la velocidad y eficacia de polimerización, se realizó dicho estudio con respecto al tiempo (Figura 5.14.). La temperatura que se seleccionó para posteriores síntesis fue la de 25°C puesto que dicha temperatura se sitúa lejos de la temperatura de desnaturalización enzimática y el tiempo en el que se llega al menos al 95% de la polimerización sucede a los 90 min. Valor que coincide con el anteriormente expuesto para la concentración de agente entrecruzante.

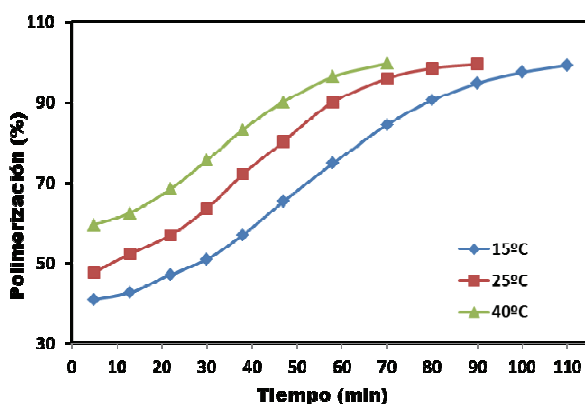


Figura 5.14.: Temperatura del medio de reacción a lo largo del proceso de polimerización en la síntesis de micropartículas según la concentración de PSA

La caracterización de las micropartículas por microscopía electrónica de barrido y Galai-cis 1 se muestran en las Figuras 5.15. y 5.16. En la Figura 5.15. se muestra la micrografía de las micropartículas de p-AMA de $\eta = 0,37\%$ con GOx en su interior, mientras que en la Figura 5.16. se representa la distribución de tamaños de las micropartículas obtenida. Como se observa, las micropartículas presentan una forma esférica, con polidispersidad de tamaños y un tamaño medio de $5,04 \mu\text{m}$, tamaño similar a las micropartículas sin enzima en su interior que fue de $4,85 \mu\text{m}$. Cuando se realizó el estudio de tamaños de partículas por dispersión de luz laser, dichos tamaños fueron corroborados, no encontrándose tamaños inferiores a $2 \mu\text{m}$.

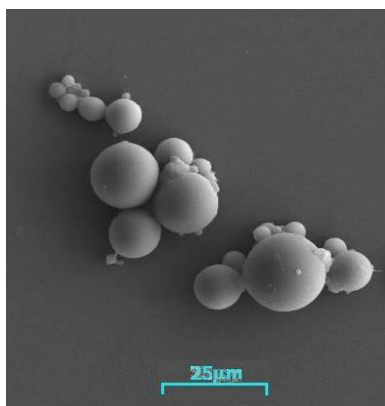


Figura 5.15.: SEM de micropartículas de p-AMA ($\eta = 0,37\%$) con enzima en su interior

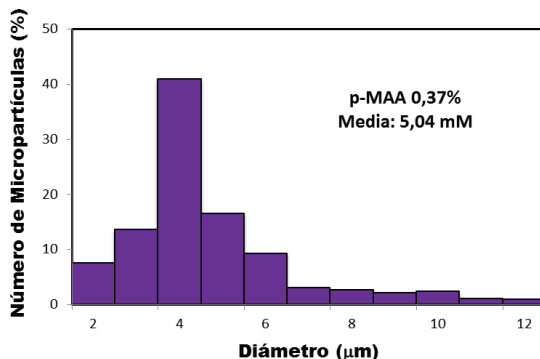


Figura 5.16. Distribución de tamaños para micropartículas de p-AMA ($\eta = 0,37\%$) con GOx, en una disolución tampón de acetato/fosfato $0,05 \text{ M}$ pH $6,0$

5.3.2. Caracterización de la matriz polimérica

En la Figura 5.17. se muestra el difractograma obtenido con las diferentes micropartículas de p-AMA con distintos grados de entrecruzamiento. En todos ellos se observan picos que se corresponden con aquellos característicos de la enzima GOx y que se sitúan todos los difractogramas a $2\theta = 12,48$ grados, $2\theta = 16,36$ grados y $2\theta = 20,03$ grados. Esto indica que la enzima está cristalizada dentro de la matriz polimérica.

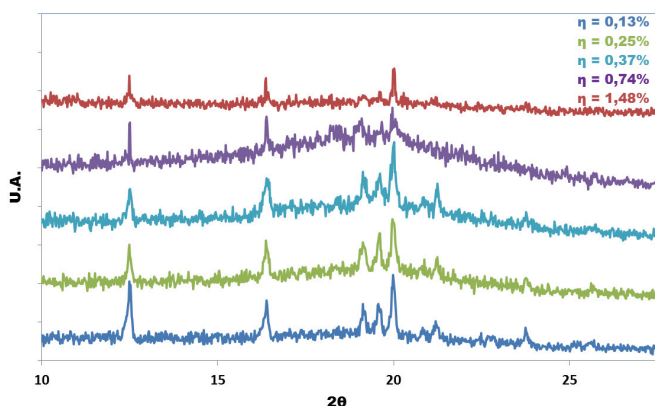


Figura 5.17. Difractogramas de rayos X de microgeles de p-AMA para los distintos grados de reticulación con GOx

En la Figura 5.18. se muestran los resultados obtenidos en el estudio de la temperatura de transición vítrea (T_g) a las distintas concentraciones de agente reticulante, variando desde 0,13 a 1,48%. Antes de realizar el barrido calorimétrico y para eliminar el pico correspondiente a la evaporación del agua, se procedió al secado de las micropartículas a 150°C durante 15 minutos. Los termogramas se realizaron en el intervalo de temperatura de 25°C a 300°C . Para el calculo de la T_g , se considera la temperatura media a la que se produce el salto en la capacidad calorífica, tal y como se muestra en la Figura 5.18. para todas las micropartículas estudiadas. No se observa una relación lineal entre el aumento del grado de reticulación y el valor de la T_g , que podría ser debido a las mínimas variaciones que existen entre las concentraciones de agente entrecruzante utilizadas, que hace que prácticamente la T_g no varíe.

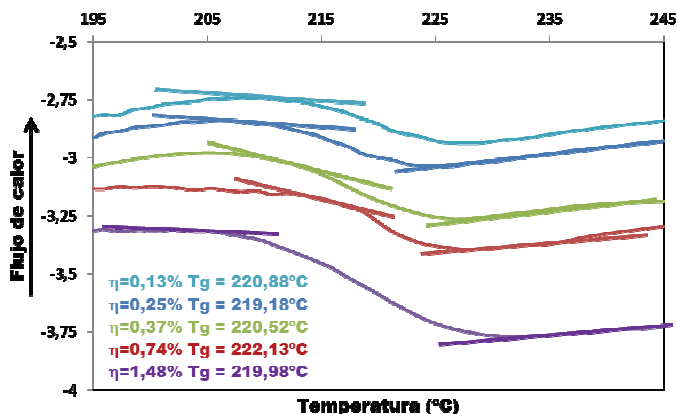


Figura 5.18.: Registros calorimétricos de micropartículas de p-AMA con GOx, para los distintos grados de reticulación

5.3.3. Propiedades del biosensor

En la Figura 5.19. se muestra las curvas de calibrado de los biosensores de distintos grados de reticulación con microgeles de p-AMA con glucosa oxidasa. Se observa que la intensidad máxima obtenida se produce cuando el grado de reticulación es de 0,37%. Las condiciones experimentales utilizadas para la realización de estas curvas de calibrado fueron: 0,05/0,05 M de tampón acetato/fosfato a pH 7,0, T^a 25°C y de 0,6 V vs SCE.

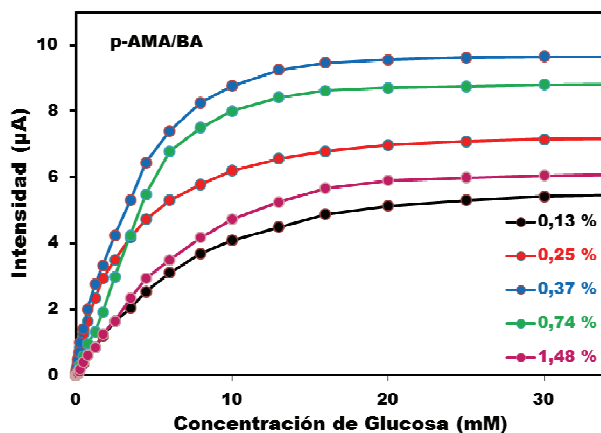


Figura 5.19.: Curvas de intensidad en función de la concentración de glucosa para micropartículas de p-AMA con GOx, para los distintos grados de reticulación (η)

La temperatura es uno de los factores que más efecto tiene sobre la respuesta de un biosensor, no sólo por su efecto sobre cada uno de los procesos que en él transcurren, difusión, reacción catalítica y reacción electródica, sino también por el proceso de desnaturalización que sufren las enzimas al superar una temperatura dada. Es necesario conocer el intervalo de temperatura en el que la enzima es activa y dentro de éste intervalo, es interesante conocer la temperatura de mayor actividad. El estudio de la temperatura se realizó dentro del rango comprendido entre 0°C y 60°C, manteniendo el pH constante e igual a 7,0, y realizando todos los experimentos bajo condiciones de saturación de oxígeno.

Como puede verse en la Figura 5.20. (a), la temperatura óptima para la actividad enzimática es de 35 °C. La temperatura de máxima actividad de la enzima libre es de 30 °C¹⁷¹, lo que demuestra que este tipo de inmovilización protege la actividad enzimática. Como muestra la Figura 5.20. (b), el estudio de Arrhenius para GOx inmovilizada en micropartículas de p-AMA con $\eta = 0,37\%$ presenta dos regiones. Las energías de activación resultaron ser 37,41 y 93,33 KJ/mol, respectivamente. Ambas energías de activación son significativamente mayores que la obtenida para la enzima libre, que se encontró que era 14,6 KJ/mol¹⁷². Este cambio de pendiente se ha estudiado para micropartículas de p-AMA con diversos grados de entrecruzamiento, apareciendo siempre a una temperatura de 14°C aproximadamente, y atribuyéndose a un cambio a la transición de volumen del microgel ya que el polímero es temperatura dependiente. Por encima de la temperatura de corte, el microgel está hinchado. A bajas temperaturas el microgel se encuentra en la fase colapsada, la cantidad de agua retenida en el microgel es reducida dificultando la reacción sustrato-enzima y consecuentemente, la energía de activación se ve aumentada. Además, en la región de bajas temperaturas, se observa un aumento de la E_a con el grado de reticulación que podemos atribuir al aumento de la densidad de la matriz cuando el polímero está colapsado, que crece con la reticulación, lo que

¹⁷¹ L. Ying, E.T. Kang, K.G. Neoh, *J. Membrane Sci.* **208**, 361 (2002).

¹⁷² S. Cosnier, S. Szunerits, R.S. Marks, A. Novoa, L. Puech, E. Perez, I. Rico-Lattes, *Talanta*. **55**, 889-897 (2001)

hace que la reacción enzima-sustrato se encuentre dificultada. En la región de altas temperaturas este efecto no aparece debido a que el polímero está hinchado, por lo que la enzima está rodeada de agua, y por lo tanto la energía de activación apenas se modifica con el grado de reticulación.

Aunque hemos comprobado que la mayor actividad enzimática se lleva a cabo entre el 35 y 40 °C, se investigó si a estas temperaturas la enzima conserva completamente su actividad. Para ello se estudió la cinética de degradación a diferentes temperaturas que sufren los biosensores con una concentración de glucosa 30 mM, manteniendo constante la temperatura durante 1 hora, comprobando la intensidad en el tiempo 0 y en 60 minutos (Tabla 5.6.). Cuando la temperatura supera los 30 °C, se observó una disminución de la actividad con el tiempo, debido a la desnaturalización que la enzima sufre a esas temperaturas.

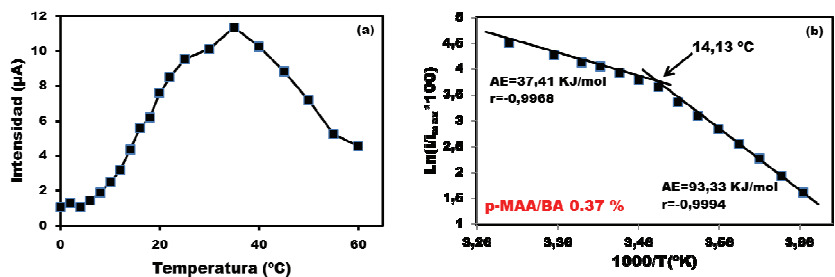


Figura 5.20.: Efecto de la temperatura de trabajo (a) y representación de Arrhenius (b) para GOx inmovilizada en p-AMA $\eta = 0,37\%$, sobre la respuesta biosensor a 30 mM de glucosa. Condiciones experimentales: 0,05/0,05 M de tampón acetato/fosfato a pH 7,0 y de 0,6 V vs SCE.

Temperatura (°C)	Intensidad t = 0s (µA)	Intensidad t = 60s (µA)	% de Degradación
25	10.0	10.0	0.00
30	11.5	11.5	0.00
35	14.5	12.5	13.79
40	17.0	14.0	17.65

Tabla 5.6.: Cinética de la degradación de la enzima en micropartículas de p-AMA con un grado de reticulación de 0,37%. Condiciones experimentales: 0.05/0.05 M de tampón acetato/fosfato de pH 7,0 y de 0,6 V vs SCE.

Para comprobar la influencia del pH sobre la respuesta del biosensor a una disolución de glucosa de 30 mM, se utilizaron tampones acetato/fosfato 0,05M, con pH comprendidos entre 4,0 y 8,0, manteniendo constante la temperatura a 30 °C (Figura 5.21.). Al ser este p-AMA un polímero dependiente del pH, aquellos valores por debajo de su pKa provocan el colapso en el microgel, mientras que valores superiores al pKa provocan el hinchamiento del mismo¹⁷³. El pH óptimo se encontró que era 6,0 coincidente con el pH óptimo de la enzima libre, lo que indica que la función catalítica de la GOx no se ve afectada por el proceso de inmovilización propuesto.

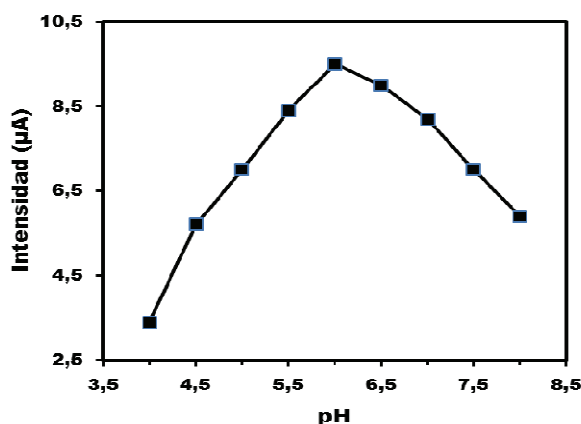


Figura 5.21.: Respuesta del biosensor en función del pH

Para comprobar la estabilidad del electrodo, almacenado en tampón acetato/fosfato de pH 7,0, se midió periódicamente la respuesta del biosensor a una disolución de glucosa de 0,25 mM, potencial de 0,6 V vs SCE, 30 °C. Después de 550 días, el biosensor mantenía un 90% de la señal obtenida el primer día (Figura 5.22.).

¹⁷³ J. Zhang, N.A. Peppas, *Macromolecules*. **33**, 102 (2000).

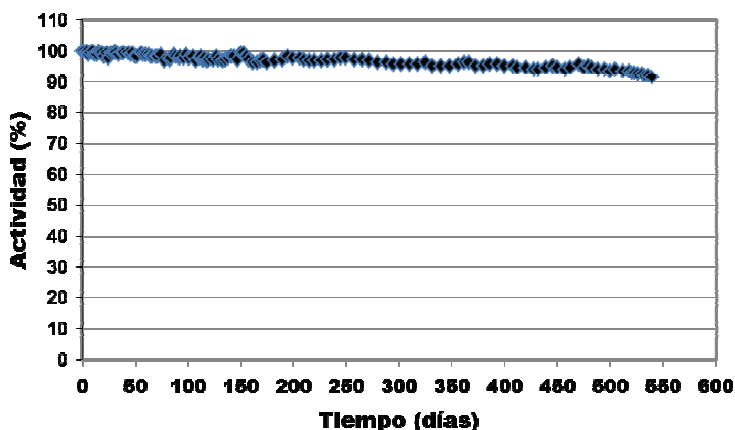


Figura 5.22.: Estudio de estabilidad para el biosensor de p-AMA. El biosensor se mantuvo en tampón acetato/fosfato a -4°C cuando no estaba en uso.

5.3.4. Propiedades analíticas

Utilizando las condiciones óptimas ($\eta=0,37\%$, potencial $+0,6\text{V}$, pH 6,0 y 30°C), se realizó la curva de calibración para el biosensor de glucosa obteniéndose las siguientes propiedades: sensibilidad de $11,98 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$, densidad de corriente máxima $126,63 \mu\text{A cm}^{-2}$, rango lineal comprendido entre $9,0 \times 10^{-6}$ y $8,26 \times 10^{-3} \text{ M}$, y límite de detección de $10 \mu\text{M}$.

La precisión del biosensor se evaluó en términos de repetibilidad mediante la realización de 10 mediciones sucesivas en diferentes soluciones de sustrato. La concentración de glucosa de las soluciones cubría todo el rango lineal (0,25 mM, 2,5 mM, y 5 mM). Los coeficientes de variación (CV) obtenidos para cada concentración fue de 5,7, 2,9 y 1,8% respectivamente. Nuestros resultados se compararon con los obtenidos utilizando la ecuación de Horwitz¹⁵⁵, $\text{CV} (\%) = 2^{(1-0,5\log C)}$, y en todos los casos el CV fue menor que los valores Horwitz. Además se realizaron en dos días diferentes, 20 mediciones con una concentración de glucosa de 2,5 mM (concentración intermedia), no observándose cambios en el valor medio o en la dispersión de datos. Al comparar el valor de p correspondiente a las medias y las varianzas de las mediciones efectuadas cada

día (valor $p = 0,8798$ para el promedio y el valor $p = 0,8867$ para varianzas) no hubo diferencias estadísticamente significativas.

5.3.5. Estudio de interferencias

Con el fin de conocer la posible utilidad de este biosensor en la determinación de glucosa en sueros, se realizó un estudio de interferencias. El biosensor enzimático de glucosa opera a un potencial de $+0,6$ V vs. ECS, potencial donde la presencia de especies fácilmente oxidables presentes en sueros sanguíneos humanos tales como el ácido ascórbico y el ácido úrico interfieren en la determinación de glucosa.

El Nafion® es una matriz polielectrolítica cargada negativamente debido a que posee en su estructura gran cantidad de grupos $-\text{SO}_3^+$, por lo que al ser depositada en la superficie del electrodo, pueden eliminar estas interferencias ya que puede reducir, e incluso impedir el acceso a la superficie electródica de sustancias cargadas negativamente. Al utilizar una disolución de trabajo con un pH de 6,0, tanto el ácido úrico como el ácido ascórbico (con pK_a 5,4 y pK_a 4,2 respectivamente) presentan carga neta negativa por lo que el Nafion®, también cargado negativamente, podría impedir el acceso de estas sustancias a la superficie del electrodo.

Se ha estudiado la respuesta del biosensor enzimático de p-AMA (GOx-biosensor) frente al ácido ascórbico y ácido úrico, observándose señales significativas para ambos compuestos, con intensidades muy similares a los obtenidos con glucosa. Con el fin de eliminar estas interferencias, se depositaron 50 μL de una disolución de Nafion® al 5% (p/p) sobre la superficie electródica, la película se secó al aire durante 15 minutos, y después, se sometió a 80°C durante 45 minutos. Posteriormente, las micropartículas de p-AMA se colocaron sobre la película de Nafion® y se mantuvieron próximas a la superficie del electrodo mediante una membrana de diálisis (GOx-Nafion-biosensor). La Figura 5.23 (a) ilustra la intensidad de corriente producida por

disoluciones de 0,25 mM de ácido ascórbico, ácido úrico y glucosa cuando se utilizó un biosensor preparado sin membrana de Nafion®, obteniéndose respuesta en los tres casos. Por el contrario, cuando se utilizó el biosensor con Nafion® (Figura 5.23 (b) aunque la respuesta a glucosa fue menor, no se observó respuesta al añadir tanto ácido úrico como ácido ascórbico. Aunque la membrana de Nafion® reduce la respuesta del biosensor a la glucosa (entorno a un 40%), resulta útil para eliminar las señales de estas especies interferentes. Según estos resultados, consideramos que la incorporación de una película de Nafion® al biosensor, permitirá su uso en la determinación de glucosa en sueros.

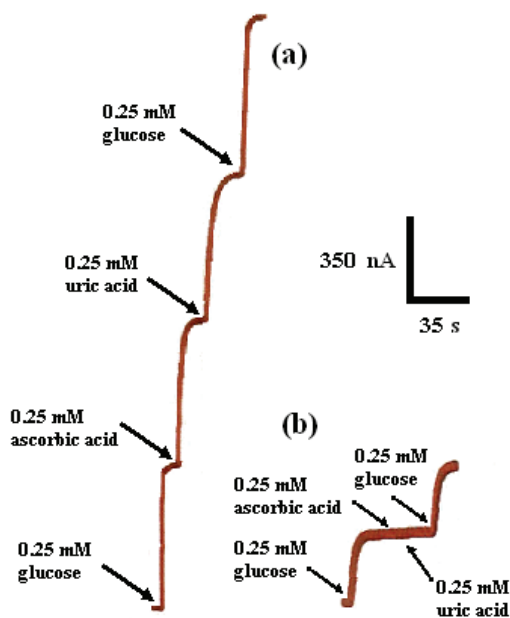


Figura 5.23.: Respuesta del biosensor (a) sin capa de Nafion® y (b) con película de Nafion® a 0,25 mM de glucosa, ácido ascórbico y ácido úrico.

5.3.6. Determinación de glucosa en sueros sanguíneos

Para comprobar la utilidad de estos biosensores, se tomaron 5 muestras de sueros y se determinó la concentración de glucosa mediante los biosensores propuestos: GOx-biosensor y GOx-Nafion-biosensor. Como

método de referencia para la determinación de glucosa de estos sueros se utilizó el método espectrofotométrico de hexoquinasa descrito por Young¹⁷⁴. Se realizó un estudio de determinación de glucosa en sueros sanguíneos (Tabla 5.7), obteniéndose buenos resultados cuando se utiliza Nafion® en la fabricación del biosensor, que elimina las interferencias producidas por el ácido ascórbico y ácido úrico presentes en el suero.

Los valores de glucosa encontrados en los sueros con el biosensor preparado sin película de Nafion fueron siempre mayores que los obtenidos con el método de referencia con diferencias entre 1,0 – 5,1%, lo que indica que las muestras de suero contienen sustancias que interfieren en la medida electroquímica. Por el contrario, las medidas de glucosa en suero obtenidas con el biosensor que incluye la capa de Nafion® fueron similares a las obtenidas con el método espectrofotométrico, las diferencias entre ellos nunca fueron mayores del 1,1%, dando errores positivos y negativos, lo que confirma que la película de Nafion® reduce considerablemente las interferencias causadas por estos compuestos, obteniéndose un biosensor más selectivo a glucosa y con una buena precisión ($CV \leq 1,1\%$).

En el estudio de recuperación se obtuvo un porcentaje de recuperación que varía entre el 94,8 y el 100,2% para el biosensor de glucosa al que no se le ha añadido una capa de Nafion®, mientras que para aquel biosensor al que en la superficie del electrodo se le aplicó una película de Nafion®, el porcentaje de recuperación obtenido se encontró en valores comprendidos entre el 99,6 y el 101,5% (Tabla 5.8).

¹⁷⁴ D.S., Young, *Effects of drug on clinical laboratory test*, third edition, AACC Press, Washington (1990).

MUESTRA	GLUCOSA (mg/dl) Método de Referencia	GLUCOSA ^a (mg/dl) GOx- biosensor	CV (%)	Biosensor GOx Desviaciones ^b (%)	GLUCOSA ^a (mg/dl) Biosensor GOx-Nafion®	CV (%)	Biosensor GOx-Nafion® Desviaciones ^b (%)
1	99,0	104,1±1,9	1,9	+5,1	100,1±0,5	0,5	+1,1
2	89,0	92,6±2,0	2,3	+4,1	88,8±2,0	2,2	-0,2
3	176,0	178,9±0,2	1,2	+1,8	174,0±0,9	1,9	-1,0
4	116,0	117,2±1,5	1,2	+1,0	114,8±1,2	1,8	-0,5
5	93,0	95,7±0,3	0,3	+2,8	93,5±0,4	0,4	+0,5

Tabla 5.7.: Resultados cuantitativos obtenidos del análisis de suero sanguíneo a partir del método espectroscópico (método de referencia), Biosensor-GOx y Biosensor GOx-Nafion.

MUESTRA	BIOSENSOR de GOx			BIOSENSOR de GOx-Nafion®		
	GLUCOSA ANADIDA (mg/dl)	GLUCOSA OBTENIDA ^a (mg/dl)	RECUPERACIÓN (%)	GLUCOSA OBTENIDA ^a (mg/dl)	RECUPERACIÓN (%)	
1	72,0	72,1±0,8	100,2	72,8±1,6	101,2	
2	72,0	72,1±0,8	100,1	73,0±1,9	101,5	
3	72,0	71,6±1,1	97,5	72,0±2,1	100,0	
4	72,0	71,9±0,7	94,8	71,7±2,2	99,6	
5	72,0	71,5±1,2	99,3	72,0±1,5	100,0	

^a Media de tres medidas

Estudio de recuperación usando ambos biosensores de glucosa^a

Tabla 5.8.:

A pesar de la existencia de especies interferentes en el caso de utilizar el biosensor sin película de Nafion®, la recuperación obtenida se mantuvo entre 94,8 y 100,2%, lo que confirma que estas especies generan una señal en el transductor, pero no interaccionan con el analito, es decir, aunque la señal registrada no puede relacionarse con la concentración de glucosa, la señal generada por la glucosa no se ve afectada por la presencia de estas especies.

5.4. Microgeles de metacrilatos como sistema de inmovilización enzimática

La preparación de las micropartículas con la enzima glucosa oxidasa, se realizó mediante el método de polimerización desde emulsión concentrada con las mismas características que las expuestas en el punto 3.3.1. La fase acuosa sin embargo en este caso, está formada por una disolución reguladora de acetato 0,05M/fosfato sódico 0,05M, a un pH de 6,0, el monómero (PEGMEM, DMAEM y AMA), el agente reticulante (N-N'-metilen-bis-acrilamida) y el agente iniciador (persulfato de amonio).

Para este estudio se fue variando el η (%) entre 0,34% y 5,82% para microgeles de p-PEGMEM; entre 0,25% y 1,48% para microgeles de p-DMAEM y entre 0,13% and 1,48% para microgeles de p-AMA.

En la Tabla 5.9. se muestran las relaciones de la actividad del sobrenadante para cada grado de reticulación dependiendo del polímero utilizado, ya que la enzima utilizada para todos los casos fue GOx. Dicha actividad del sobrenadante se realizó amperométricamente, añadiendo distintas concentraciones de glucosa a una celda termostatzada con tres electrodos Se aplica un potencial de + 0,6V al electrodo de trabajo y que al añadir la cantidad conocida de sustrato (30 mM de glucosa), generará un aumento de la intensidad de corriente en el caso de que exista enzima en el líquido sobrenadante.

Polímero	η (%)	Actividad del Sobrenadante
p-PEGMEM	0,34	NO
	0,74	NO
	1,48	NO
	5,82	NO
p-DMAEM	0,25	SI
	0,37	NO
	0,74	NO
	1,48	NO
p-AMA	0,13	SI
	0,25	NO
	0,37	NO
	0,74	NO
	1,48	NO

Tabla 5.9. Relación entre la actividad del sobrenadante con el grado de reticulación (η)

La detección de actividad enzimática en el líquido sobrenadante obtenido en la síntesis, indica la salida de enzima de las micropartículas probablemente debido al tamaño de poro de los microgeles con un grado de reticulación pequeño, superior al tamaño de la enzima, comportamiento que coincide con el anteriormente mostrado para las micropartículas sintetizadas con PAAM.

Con el fin de conocer cómo afecta la reacción de polimerización a la eficacia del atrapamiento enzimático relativa a la actividad enzimática, se midió dicha actividad enzimática de las micropartículas con la enzima GOx y la actividad enzimática de la misma cantidad de enzima libre. Así para la GOx se determinó el contenido de glucosa en un preparado empleando para ello un método enzimático espectrofotométrico citado en el apartado 3.2.4. Se encontró que la actividad enzimática de las dispersiones de micropartículas fueron un 88,0%, un 91,0% y un 8,07% de la actividad enzimática de la disolución de enzima para p-PEGMEM, p-DMAEM y p-AMA respectivamente. Es decir, el método de inmovilización propuesto supone una pérdida de

entre el 9,0% y 13,0 % de la actividad enzimática según el polímero utilizado.

Para el estudio de la concentración de monómero en el medio de reacción, en la respuesta del biosensor se realizó tomando como referencia las micropartículas obtenidas en las distintas síntesis con PAAm (0,75 g de monómero), realizando las distintas síntesis según los monómeros derivados de metacrilato, siendo el equivalente a 0,75 g para p-PEGMEM, una concentración de 833 mM, para el p-DMAEM, una concentración de 1590 mM, para el p-AMA, una concentración de 2903 mM. Las concentraciones utilizadas para cada uno de los monómeros vienen reflejadas en la Tabla 5.10. Los valores óptimos de respuesta para cada polímero, se encuentran marcados, y se obtienen de las curvas de calibrado. Como puede observarse la concentración óptima de monómero utilizada en la síntesis de las micropartículas, varía dependiendo del peso molecular del monómero utilizado, así cuanto menor el dicho peso molecular, la concentración de monómero utilizada aumenta. Todos los valores obtenidos se realizaron bajo una concentración de enzima GOx de 425 UI/ml, con un pH de trabajo y de síntesis de 6,0 y a una temperatura de trabajo de 25°C.

p-PEGMEM Pm = 300 g/mol d = 1,050 g/ml	p-DMAEM Pm = 157,21 g/mol d = 0,933 g/ml	p-AMA Pm = 86,09 g/mol d = 1,015 g/ml
100 mM		
210 mM		
	795 mM	795 mM
833 mM		
	915 mM	
1170 mM		
	1193 mM	1193 mM
	1590 mM	1590 mM
		2903 mM

Tabla 5.10.: Relación de las distintas concentraciones de los distintos monómeros de metacrilato

Otro aspecto importante, es evaluar cómo varia la temperatura en función de la evolución de la polimerización, para asegurar la estabilidad de la enzima atrapada. El estudio de la temperatura de polimerización y del porcentaje de polimerización con el tiempo, se realizó para todos los polímeros con 3 experiencias a distintas concentraciones de agente iniciador (PSA): 9,86, 10,96 y 21,92 mM. Cuando se aumenta la concentración de PSA, disminuye el tiempo de polimerización, con valores muy similares entre sí y que se encuentran en torno a 70, 90 y 110 minutos para, 21,92, 10,96 y 9,86 respectivamente, en todos los casos elegimos 10,96 mM, ya que además así, no se ve comprometida la temperatura en la polimerización con respecto a la enzima, no superando para esta concentración de PSA de 10,96 mM, en ningún caso valores superiores a 22°C. Sin embargo cuando se utiliza el valor superior (21,92 mM), a pesar de que el tiempo sea menor, la temperatura a la que se llega durante la polimerización supera los 30°C, temperatura que para podría poner en peligro la estructura de la enzima, por lo que para preservar dicha estructura se decidió utilizar como concentración 10,96 mM.

La síntesis por el método de emulsión concentrada, da lugar a micropartículas de forma esférica con gran polidispersidad de tamaños en todas las muestras, con una distribución de tamaños con diámetros comprendida entre 2 y 12 μm y con tamaños medios que oscilan entre 5,2 μm para micropartículas de p-PEGMEM con GOx, 5,0 μm sin GOx, 4,94 μm para micropartículas de p-DMAEM con GOx, 5,0 μm sin GOx y 5,04 μm para micropartículas de p-AMA con GOx, 4,85 μm sin GOx. Estos datos son similares a los obtenidos en micropartículas de PAAm (anteriormente detallado en esta tesis).

Para el estudio de la estructura se realizaron difracciones de rayos X de las micropartículas con y sin enzima a los distintos grados de reticulación para cada uno de los distintos polímeros. Los difractogramas de todas las micropartículas de los diversos metacrilatos con la enzima, presentan los picos característicos de un polímero amorfo, tal y como se manifiestan para las micropartículas sin enzima, sin embargo también aparecen picos cristalinos que coinciden con los de la enzima sola (inlet), y que se

encuentran a $2\theta_1=12,48^\circ$, $2\theta_2=16,36^\circ$ $2\theta_3=20,03^\circ$ (Figura 5.24.), lo que indica que ésta se encuentra en forma cristalina. Esto se explica teniendo en cuenta que la inmovilización se lleva a cabo en un medio oleoso, donde están disueltas las cadenas del polímero, y en el que la enzima está dispersada en forma de cristales de pequeño tamaño, que son los que forman parte de las gotas de la fase interna de esta emulsión, y que además, como los metacrilatos poseen un peso molecular inferior a la PAAM, y por tanto la red sintetizada es menos densa y permite que el haz llegue a la estructura tridimensional de la enzima.

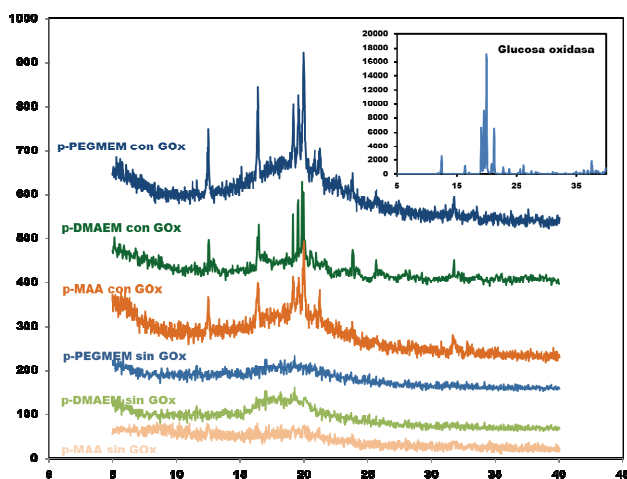


Figura 5.24.: Difractogramas de las diferentes micropartículas de metacrilatos con y sin GOx inmovilizada.

Los distintos termogramas de DSC realizados para las diferentes micropartículas obtenidas, dieron como resultado para p-PEGMEM, valores de Tg se encuentran entre -68°C y -61°C , temperaturas similares a las que aparecen en la literatura¹⁷⁵⁻¹⁷⁷. Los resultados mostraron

¹⁷⁵ H. Wu-Huan, C. Chuh-Yung, *Electrochim. Acta.*, **49**, 2105 (2004).

¹⁷⁶ H. Wu-Huan, C. Chuh-Yung, W. Cheng-Chien, H. Yao-Hui, *Electrochim. Acta.* **48**, 679 (2003).

¹⁷⁷ H. Wu-Huan, C. Chuh-Yung, W. Cheng-Chien, *Polymer*. **44**, 2983 (2003).

¹⁷⁸ J. Brandrup, E.H. Immergut, E.A. Grulke, *Polymer Handbook*, Wiley-Interscience, New York. VI-202 (1999).

¹⁷⁹ E. Lugo-Medina, A. Licea-Claveríe, J.M. Cornejo-Bravo, K. Friedrich Arndt, *React. Func. Polymers*. **67**, 67 (2007).

en el caso de p-DMAEM que los valores de Tg se ubicaron entre 19,0 °C y 22,55 °C, similar al reportado en la literatura^{178, 179}. Así como los labores de Tg obtenidos para p-AMA se sitúan entre 219,18 °C y 222,18 °C, valores similares a los reportados en la literatura¹⁸⁰⁻¹⁸².

5.5. Biosensores para la determinación de glucosa preparados con microgeles de metacrilatos con glucosa oxidasa.

Las matrices poliméricas de p-PEGMEM, p-DMAEM y p-AMA se han utilizado como sistema de inmovilización de la glucosa oxidasa para formar un biosensor amperométrico de glucosa. El objetivo de este apartado es esquematizar los resultados obtenidos en este trabajo comparando las propiedades analíticas más importantes a tener en cuenta en el diseño de un biosensor, como son la sensibilidad, tiempo de respuesta, estabilidad y precisión, además de la posibilidad de utilización de estos dispositivos para el análisis de glucosa en sueros sanguíneos.

Con el objetivo de optimizar el diseño del biosensor para conseguir la máxima respuesta y en el menor tiempo, se ha realizado un estudio individualizado de aquellos factores experimentales que pueden influir en la respuesta del biosensor, tales como el potencial aplicado, pH, temperatura y carga enzimática.

Para estudiar la influencia del potencial para cada una de las matrices utilizadas, se midió la intensidad de corriente obtenida con una disolución de glucosa 0,25 mM variando el potencial del electrodo de trabajo de +0,2 a +0,8 V vs. ECS. En todos los estudios se produjo un aumento de la intensidad de corriente entre potenciales de +0,2V a +0,6V y se mantuvo constante una vez alcanzado este valor. Todos los estudios posteriores realizados en cada una de las distintas matrices de metacrilato se realizaron bajo un potencial de +0,6V.

¹⁸⁰ A. Gültek, T. Seçkin, Y. Önal, M.G. İçduygu, *Tur J. Chem.* **26**, 925 (2002).

¹⁸¹ R. Rutkaite, G. Buika, N. Kreiveniene, J.V. Grazuleviciun, *Polymer deg. & stab.* **78**, 143 (2002).

¹⁸² G. Rincon, J.C. Soutif, *Rev. Tec Ing. Univ Zulia* **30(1)**, 85 (2007).

Para no cambiar la naturaleza de los aniones ya que podrían interaccionar con el sustrato y la enzima, el estudio de la influencia del pH se realizó en todas las matrices estudiadas con una disolución tampón compuesto por acetato 0,05M/fosfato 0,05M, ajustando el pH al valor deseado. Dentro de los polímeros estudiados, existe una matriz que no es dependiente del pH (p-PEGMEM), no presentando ningún grupo funcional ionizable que pueda ionizarse en el medio utilizado en función del pH o de la fuerza iónica, sin embargo las otras dos matrices, p-DMEAEM y p-AMA, presentan grupos funcionales ionizables, siendo estos un grupo amino y un grupo carboxilo respectivamente, lo que les conferirá una carga distinta en función del pH utilizado. En el caso del p-DMEAEM, cuyo pKa se sitúa entre 7 – 7,3 y presentando como grupo funcional ionizable un grupo amino, la carga que presentará en valores inferiores al pKa será positiva, lo que implica el hinchamiento de los microgeles, mientras que para valores superiores al pKa la carga presentada será negativa, lo que implica el colapso de los microgeles. En el caso del p-AMA, sin embargo su valor de pKa es 4,66 y su grupo funcional ionizable es un grupo carboxilo, lo que significa que la carga que presentará en valores superiores al pKa será negativa, lo que implica el hinchamiento de los microgeles, mientras que para valores inferiores al pKa la carga presentada será positiva, lo que implica el colapso de los microgeles. Para poder estudiar la interacción polímero-enzima, se debe considerar la carga de la glucosa oxidasa según el pH. Considerando que el pI de la GOx es de 4,2, su carga neta será negativa en el intervalo de pH estudiado de 5 a 8..

Si tenemos en cuenta el pH óptimo de los biosensores estudiados para cada una de las matrices, se observa como en todos los casos el pH óptimo se mantuvo entre 6,0 y 6,5, coincidente con el pH de máxima actividad y estabilidad de la glucosa oxidasa. A esos valores de pH, la enzima GOx presenta carga negativa, mientras que los polímeros dependientes de pH presentan carga positiva para p-DMEAEM y negativa para p-AMA. Esta diferencia de cargas entre las matrices y la enzima se refleja en la respuesta obtenida del biosensor, ya que los mejores resultados son para las micropartículas de p-DMEAEM, entendiendo que se produce una atracción electrostática entre enzima, con carga negativa, y matriz polimérica cargada

positivamente. Esto conlleva una mejora de las propiedades analíticas del biosensor propuesto.

A la hora de realizar el estudio de la temperatura, se observa en todos los casos que cuando la temperatura de trabajo supera los 30°C, la intensidad de corriente decrece debido al comienzo del proceso de desnaturalización de la enzima. Esta temperatura de 30°C se considerará como la óptima para todos los experimentos posteriores en cada una de las matrices. A pesar de que dos de las matrices utilizadas son temperatura dependiente (p-PEGMEM y p-AMA), el posible efecto que la dependencia a la temperatura debería generarse en la respuesta obtenida para cada uno de los biosensores con las distintas matrices no se ve reflejado, debido a que a la temperatura óptima obtenida para todos ellos, provoca que los microgeles se encuentren hinchados.

Al comparar los resultados obtenidos en la representación de Arrhenius con los biosensores de glucosa oxidasa estudiados, se observan 2 tramos lineales de cuyas pendientes se derivan 2 energías de activación (E_a). Las E_a en la región de bajas temperaturas varían desde 43,11 a 93,33 KJ/mol (Tabla 5.11.). Las energías de activación obtenidas con los biosensores de micropartículas poliméricas en la zona de altas temperaturas es similar a la obtenida para GOx en disolución (14,6KJ/mol)¹⁴⁹ solamente cuando trabajamos con micropartículas de p-PEGMEM, por el contrario se observa un valor mucho más elevado para p-DMAEM y p-AMA. Valores similares en las E_a a los encontrados cuando se utilizan micropartículas con PAAM¹³².

Biosensor Glucosa	Energía de Activación (E_a)	Temperatura de corte
Micropartículas de p-PEGMEM	15,43 KJ/mol	12,86 °C
	48,58 KJ/mol	
Micropartículas de p-DMAEM	23,31 KJ/mol	13,03 °C
	43,11 KJ/mol	
Micropartículas de p-AMA	37,41 KJ/mol	14,13 °C
	93,33 KJ/mol	

Tabla 5.11.: Energías de activación a partir de la representación de Arrhenius para las distintas micropartículas de metacrilato

Los puntos de corte de las rectas varían desde 12,86°C a 14,13°C. Puntos de corte de similares características obtenidos con otras micropartículas obtenidas con el mismo sistema de síntesis. La elevación en los valores obtenidos para las E_a , podría deberse al aumento de monómero necesario en la síntesis para la obtención de las diferentes micropartículas.

Se compararon las propiedades analíticas obtenidas de los distintos biosensores propuestos para la determinación de glucosa, observándose como la sensibilidad obtenida es de 11,98 mA M⁻¹ cm⁻² para p-AMA 17,78 mA M⁻¹ cm⁻² para p-PEGMEM y 23,40 mA M⁻¹ cm⁻² para p-DMAEM, y la densidad de corriente máxima que aumenta 126,63 μ A cm⁻² a 148,57 μ A cm⁻² o 264,71 μ A cm⁻²^{132,183}. Tal y como se observa, las mejores propiedades analíticas de los biosensores propuestos, son para las que utilizan micropartículas de p-DMAEM. Estos resultados pueden deberse a las interacciones entre la matriz y la enzima condicionadas por las cargas que ambas poseen y que en este caso hacen mejorar las propiedades analíticas del biosensor propuesto.

Al comparar los datos obtenidos con aquellos realizados utilizando el mismo sistema de inmovilización para otros monómeros, se observa que ambas propiedades analíticas se ven mejoradas cuando se utilizan derivados metacrílicos. Además, cuando estos dispositivos se comparan con otros sistemas de inmovilización, tales como auto-ensamblaje capa-por-capla de películas o de deposición sobre la superficie del electrodo¹⁸⁴⁻¹⁸⁷, se observa que la estabilidad, el límite de detección y el rango lineal mejoran significativamente (ver Tabla 5.12.).

¹⁸³ M. Sánchez-Paniagua López, D. Mecerreyes, E. López-Cabarcos, B. López-Ruiz, *Biosen. Bioelectron.* **21**, 2320 (2006).

¹⁸⁴ S.A. Miscordia, J. Desbrieres, G.D. Barrera, P. Labbé, G.A. Rivas., *Anal. Chim. Acta.* **578**, 137 (2006).

¹⁸⁵ X. Chu, D. Duan, G. Shen, R. Yu, *Talanta.* **71**, 2040 (2007).

¹⁸⁶ B.Y. Wu, S.H. Hou, F. Yin, Zi.X. Zhao, Y.Y. Wang, X.S. Wang, Q. Chen, *Biosen. Bioelectron.* **22**, 2854(2007).

¹⁸⁷ L. Wu, X. Zhang, H. Ju, *Biosen. Bioelectron.* **23**, 479(2007).

Micropartículas	Sensibilidad (mA M ⁻¹ cm ⁻²)	J _{max} (μA cm ⁻²)	Rango Lineal (M)	R ² (n)	DL (μM)	Tiempo de Respuesta
n-AMA	11.98	126.63	9.0 10 ⁻⁶ – 8.26 10 ⁻³	0.9979 (19)	10	40 seg
n-PEGMEM	17.78	148.57	2.0 10 ⁻⁶ – 7.6 10 ⁻³	0.9993 (24)	7.5	45 seg
p-DMAEM	23.40	264.71	9.0 10 ⁻⁶ – 10.2 10 ⁻³	0.9949 (26)	10	35 seg

Tabla 5.12.: Características de los biosensores con matrices de metacrilato

El tiempo de respuesta es un parámetro de gran importancia en el diseño de biosensores ya que se necesitan respuestas rápidas especialmente, si el dispositivo forma parte de sistemas de flujo, como detectores en FIA y HPLC. Al comparar los tiempos de respuesta obtenidos con los distintos biosensores, todos ellos se sitúan en valores próximos, siendo el de mejor tiempo de repuesta aquellos obtenidos con micropartículas de p-DMAEM (35 segundos).

En todos los biosensores propuestos de los diferentes monómeros, el coeficiente de variación disminuye a medida que la concentración de sustrato aumenta, obteniéndose siempre coeficientes de variación menores que los máximos aceptables según Horwitz. La precisión intermedia, realizada en días sucesivos, en los biosensores fabricados con estas micropartículas, presenta una dispersión de las medidas muy semejante en los días de estudio. Se puede concluir que los resultados obtenidos demuestran la buena precisión de las señales amperométricas obtenidas con los biosensores propuestos en la determinación de glucosa.

Las micropartículas utilizadas para la inmovilización de la glucosa oxidasa, todas ellas, liofilizadas y conservadas en refrigerador mantienen la actividad enzimática durante más de un año. La estabilidad del biosensor apenas varía dependiendo del sistema de inmovilización utilizado encontrándose valores comprendidos entre el 85 – 90 % de actividad inicial después de mas de 520 días.

Al variar la cantidad de micropartículas depositadas sobre la superficie del electrodo, se observa que a medida que aumenta la cantidad en mg de microgeles sobre la superficie del electrodo (incrementándose por tanto la carga enzimática), la zona que en teoría es controlada por la cinética de la reacción se amplía y la zona de saturación en donde la corriente del biosensor es independiente de la

concentración del sustrato se alcanza más rápidamente cuando la cantidad del microgel se disminuye sobre la superficie del electrodo debido a que más rápidamente los sitios activos de la enzima son ocupados por el sustrato (Figura 5.25).

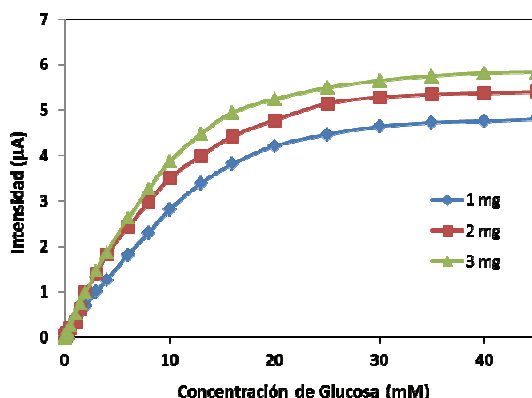


Figura 5.25.; *Curvas de calibrado de biosensores preparados con distintas cantidades de micropartículas de p-PEGMEM en la superficie del electrodo (425 UI GOx/mL de fase acuosa). Condiciones experimentales: 0,05/0,05 M de tampón acetato/fosfato de pH 7,0 y de 0,6 V vs SCE*

A bajas concentraciones del sustrato donde en teoría la reacción es gobernada por la cinética de la reacción enzimática el orden de la reacción debería ser 1 si no

existen efectos difusionales. Al representar $\log \frac{i_k}{i_{\max} - i_k}$ vs.

$\log[S]$, los valores de los índices de Hill obtenidos para los biosensores propuestos en condiciones óptimas son 1,59, 1,42 y 1,55 para p-PEGMEM, p-DMAEM y p-AMA respectivamente, observándose que los valores obtenidos del coeficiente de Hill se alejan considerablemente de 1. Estos valores nos indican que la reacción enzimática en cada uno de los biosensores está siendo afectada por diversos procesos que están ocurriendo en la cercanía de la interfase electrodo/solución. Por ejemplo, se esperaría que el coeficiente de Hill se aproxime a 1 cuando la cantidad de

microgeles que se deposita es pequeña debido a que los efectos difusionales internos deben ser mínimos al disminuir la resistencia del sustrato a difundir por la matriz sólida que conforma la cantidad de microgeles depositados. Sin embargo pueden ser otros los efectos que estarían gobernando dicho proceso. Al tener una menor cantidad de microgeles, estos van a estar rodeados por más cantidad de líquido. Las condiciones generadas alrededor del microgel cambian de tal forma que se establecen gradientes de concentración alrededor de dichas partículas ocasionando un efecto sobre la velocidad de reacción.

La Figura 5.26. muestra una representación esquemática de los efectos de difusión que se pueden desarrollar en la superficie de un biosensor amperométrico construido utilizando como soporte de la enzima microgeles.

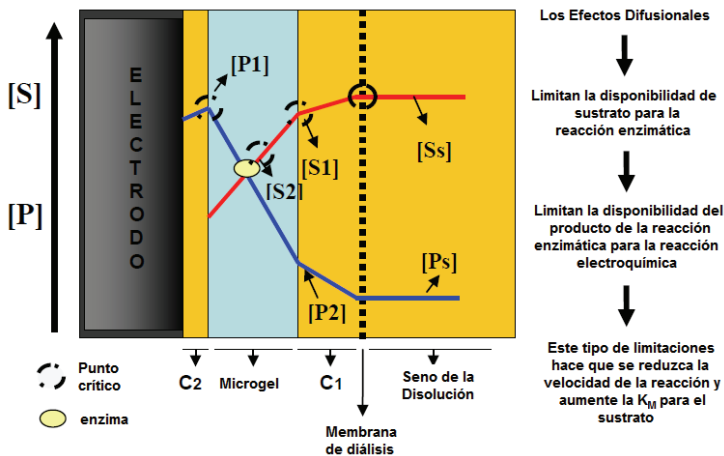


Figura 5.26.: Efectos de difusión que se pueden desarrollar en la superficie de un biosensor amperométrico construido utilizando microgeles y membrana de diálisis como soporte de la enzima

Los biosensores propuestos utilizando micropartículas de derivados de metacrilato, se utilizaron para la determinación de glucosa en muestras de sueros sanguíneos. Al determinar la concentración de glucosa en los sueros con el biosensor preparado sin Nafion®, los valores obtenidos siempre fueron mayores que los obtenidos con el método de referencia (diferencias entre 1,0

– 6,1 %), resultados coherentes si las muestras de suero contienen sustancias interferentes. Por el contrario, las diferencias entre los valores de glucosa obtenidos con el biosensor preparado con película de Nafion® y el método de referencia fueron similares, nunca mayores del 1,7%, con errores positivos y negativos, confirmando que al depositar una capa de Nafion en la superficie electródica se eliminan las interferencias causadas por estas especies presentes en el suero, obteniéndose un biosensor más selectivo a glucosa y con una buena precisión ($CV \leq 2,2\%$).

La recuperación obtenida fue similar con ambos biosensores y se mantuvo entre 94,8 y 101,5%, lo que confirma que la señal de la glucosa no se ve afectada por la existencia de interferentes en la muestra. El método analítico de determinación de glucosa en sueros con el biosensor preparado con Nafion® es un método exacto y preciso.

6

CONCLUSIONES

A continuación se exponen las principales conclusiones extraídas de este trabajo.

1. Se han preparado biosensores utilizando distintas matrices poliméricas como sistema de inmovilización enzimática a través del atrapamiento en micropartículas poliméricas entrecruzadas.

- Se han preparado tres biosensores amperométricos utilizando micropartículas de poliacrilamida, en las que se ha inmovilizado las enzimas galactosa oxidasa, colina oxidasa y acetilcolinesterasa.
- Se ha preparado un biosensor empleando como componente biológico micropartículas de poli etilenglicol metil éter metacrilato, en las que se ha inmovilizado la enzima glucosa oxidasa.
- Se ha preparado un biosensor empleando como componente biológico micropartículas de poli dimetil amino etil metacrilato, en las que se ha inmovilizado la enzima glucosa oxidasa.
- Se ha preparado un biosensor empleando como componente biológico micropartículas de poli ácido metacrílico, en las que se ha inmovilizado la enzima glucosa oxidasa.

2. En el estudio de las modificaciones estructurales que se producen en la red polimérica cuando se encapsula la enzima, se demuestra que la inmovilización de las distintas enzimas dentro de la matriz polimérica no modifica el tamaño medio de las micropartículas presentando todas las micropartículas una forma esférica, y el estudio de la distribución de tamaños indican que se trata de una población polidispersa, con diversos valores medios que se encuentran entre 3,8 y 5,2 μm .

Se ha encontrado que la incorporación de una enzima a la red polimérica modifica la transición vítrea de los polímeros amorfos.

3. El biosensor propuesto utilizando la inmovilización de galactosa oxidasa en micropartículas de poliacrilamida, presenta como principales ventajas la gran estabilidad del material biológico (mínima de 1 año), así como la fácil

preparación del biosensor (una vez preparados los microgeles con enzima se puede disponer en muy poco tiempo de un nuevo dispositivo analítico para la medida de glucosa).

4. Se ha preparado con éxito un biosensor monoenzimático, con colina oxidasa inmovilizada en poliacrilamida, y un biosensor bienzimático, mediante un proceso de inmovilización diferente, encapsulando en la matriz dos enzimas, colina oxidasa y acetilcolinesterasa para la determinación de colina y acetilcolina inmovilizadas en micropartículas de poliacrilamida. Los biosensores propuestos se utilizaron para la determinación de nicotina mediante el estudio de la inhibición reversible que esta sustancia provoca en la enzima colina oxidasa. Los resultados indican que el principio de inhibición se puede utilizar para determinar la nicotina utilizando los dos biosensores amperométricos.

5. La comparación de los resultados obtenidos con los distintos biosensores de glucosa oxidasa basados en polímeros biocompatibles derivados de metacrilato, dan como resultado que el biosensor con las micropartículas de p-DMAEM exhibió las mejores propiedades analíticas, debido a que las interacciones entre la matriz y la enzima condicionadas por las cargas que ambas poseen haga mejorar las propiedades analíticas del biosensor propuesto. El biosensor propuesto presenta una sensibilidad de $23,40 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$, una densidad de corriente máxima de $264,71 \text{ } \mu\text{A cm}^{-2}$, un rango lineal comprendido entre $9,0 \cdot 10^{-6} - 10,2 \cdot 10^{-3} \text{ (M)}$, con un límite de detección de $10 \text{ } \mu\text{M}$.

6. Los tiempos de respuesta de los dispositivos analíticos cuando se utilizan micropartículas de PAAm se sitúan en torno a los 60 segundos, mientras que los tiempos de respuesta obtenidos cuando se utilizan micropartículas con los derivados de metacrilato son menores, situándose en valores comprendidos entre 35 y 45 segundos.

7. Todas las enzimas atrapadas en micropartículas poliméricas, una vez realizada la liofilización de las micropartículas y la posterior conservación en refrigerador, mantienen su actividad enzimática durante al menos 1 año.

8. El estudio de estabilidad realizado para todos los biosensores muestra como los biosensores preparados con derivados de metacrilato presentan una estabilidad superior a 500 días, estabilidad mayor que los biosensores con poliacrilamida.

9. Los resultados del análisis de glucosa en sueros sanguíneos, han demostrado que los biosensores amperométricos preparados con micropartículas de los derivados de metacrilato (p-PEGMEM, p-DMAEM y p-AMA), fueron satisfactorios, obteniéndose valores muy próximos a aquellos obtenidos por el método de referencia.

7

ANEXO

LISTA DE ABREVIATURAS

AChE:	Acetilcolinesterasa
AMA:	Ácido metacrílico
ChOx:	Colina oxidasa
CV:	Coefficiente de variación
DMAEM:	Dimetil amino etil metacrilato
DSC:	Calorimetría diferencial de barrido
Ea:	Energía de activación
ECS:	Electrodo de calomelanos saturado
GA:	Glutaraldehído
GLOx:	Galactosa oxidasa
GOx:	Glucosa oxidasa
Jmax:	Densidad de corriente máxima
KM:	Constante de Michaelis-Menten
LCST:	Lower critical solubility temperature
LD:	Límite de detección
PAAm:	Poliacrilamida
PPO:	Tirosinasa
PEGMEM:	polietilenglicol metil éter metacrilato
PSA:	Persulfato de amonio
p-AMA:	poli(ácido metacrílico)
p-DMAEM:	poli(dimetil amino etil metacrilato)
p-NIPAM:	poli(N-isopropilacrilamida)
p-PEGMEM:	poli(polietilenglicol metil éter metacrilato)
SEM:	Microscopia electrónica de barrido
Tg:	Temperatura de transición vítrea
TEMED:	NNN'N'-tetra-metil-etilen-diamina
UI:	Unidades internacionales

